

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1939

N°

THÈSE

112

PRÉSENTÉE POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplôme d'Etat)

PAR

JAYLE, MAX-FERNAND,

né à Paris, le 2 février 1913

ANCIEN EXTERNE DES HÔPITAUX

LICENCIÉ ES-SCIENCES

ASSISTANT DE CHIMIE MÉDICALE

Etude biochimique et physiopathologique des Peroxydases animales

Président : M. POLONOVSKI, PROFESSEUR.

Travail du Laboratoire de Chimie médicale

LONS-LE-SAUNIER

IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE MAURICE DECLUME.

1939



Digitized by the Internet Archive
in 2026

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1939

N°

THÈSE

PRÉSENTÉE POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplôme d'Etat)

PAR

JAYLE, MAX-FERNAND,

né à Paris, le 2 février 1913

ANCIEN EXTERNE DES HÔPITAUX

LICENCIÉ ES-SCIENCES

ASSISTANT DE CHIMIE MÉDICALE

Etude biochimique et physiopathologique des Peroxydases animales

Président : M. POLONOVSKI, PROFESSEUR.

Travail du Laboratoire de Chimie médicale

LONS-LE-SAUNIER

IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE MAURICE DECLUME.

1939



FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

LE DOYEN..... TIFFENEAU.

I. — PROFESSEURS.

	MM.
Anatomie	ROUVIÈRE.
Physiologie	Léon BINET.
Physique médicale	STROHL.
Chimie médicale	POLONOVSKI.
Bactériologie	Robert DEBRÉ.
Parasitologie et histoire naturelle médicale	BRUMPT.
Pathologie et thérapeutique générales	BAUDOUIN.
Pathologie médicale	ABRAMI.
Pathologie chirurgicale	MONDOR.
Anatomie pathologique	LEROUX.
Histologie	CHAMPY.
Pharmacologie et matière médicale	TIFFENEAU.
Thérapeutique	HARVIER.
Hygiène et médecine préventive	TANON.
Médecine légale	BALTHAZARD.
Histoire de la médecine et de la chirurgie	LAIGNEL-LAVASTINE.
Pathologie expérimentale et comparée	FIESSINGER.
Hydrologie thérapeutique et climatologie	CHIRAY.
	LOEPER.
Clinique médicale	CARNOT.
	CLERC.
	Marcel LABBÉ.
Hygiène et clinique de la première enfance	LEREBoullet.
Clinique des maladies des enfants	NOBÉCOURT.
Clinique des maladies mentales et des maladies de l'encéphale.	H. CLAUDE.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	GOUGEROT.
Clinique des maladies du système nerveux	GUILLAIN.
Clinique des maladies infectieuses	LEMIERRE.
	CUNÉO.
Clinique chirurgicale	GOSSET.
	GRÉGOIRE.
	LENORMANT.
Clinique ophtalmologique	TERRIEN.
Clinique urologique	CHEVASSU.
	COUVELAIRE.
Clinique d'accouchements	JEANNIN.
	LÉVY-SOLAL.
Clinique gynécologique	MOCQUOT.
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	OMBRÉDANNE.
Clinique thérapeutique médicale	RATHERY.
Clinique oto-rhino-laryngologique	LEMAITRE.
Clinique thérapeutique chirurgicale	Pierre DUVAL.
Clinique propédeutique	M. VILLARET.
Clinique de la Tuberculose	TROISIER.
Clinique chirurgicale orthopédique de l'adulte	MATHIEU.
Clinique de cardiologie	LAUBRY.
Clinique de neuro-chirurgie	Clovis VINCENT.
Assistance Médico-sociale	N...
	HAZARD.
	HOVELACQUE.
Professeurs sans chaire	MULON.
	OLIVIER.
	SANNIÉ.
	VERNE.

II. — AGRÉGÉS EN EXERCICE.

MM.

AMELINE Pathologie chirurgicale.
 BARIÉTY Pathologie médicale.
 BÉNARD Henri. Pathologie médicale.
 BERNARD Étienne. Pathologie médicale.
 BESANÇON (Justin). Hydrologie.
 BOULIN Pathologie médicale.
 BULLIARD Histologie.
 CATHALA Pathologie médicale.
 CHEVALLIER . Pathologie médicale.
 COSTE Pathologie médicale.
 DOGNON Physique.
 FEY Urologie.
 FUNCK Pathologie chirurgicale.
 GALLIARD Parasitologie.
 GASTINEL Bactériologie.
 DE GAUDART D'ALLAINES. Pathologie chirurgicale.
 GAYET Physiologie.
 DE GENNES ... Pathologie médicale.
 GIROUD Histologie.
 HAGUENAU .. Pathologie médicale.
 HALPHEN Oto-rhino-laryngologie.
 HUGUENIN ... Anatomie pathologique.
 JOANNON Hygiène.
 LACOMME Obstétrique.

MM.

LANTUÉJOUL . Obstétrique.
 LAROCHE (Guy). Pathologie médicale.
 LAVIER Parasitologie.
 LELONG Pathologie médicale.
 LEMAIRE Pathologie expérimentale.
 LEVEUF Pathologie chirurgicale.
 M^{lle} J. LÉVY... Pharmacologie.
 LÉVY-VALENSI. Neurologie et Psychiatrie.
 MÉNÉGAUX .. Pathologie chirurgicale.
 MOLLARET ... Pathologie médicale.
 MOREAU Pathologie médicale.
 MOULONGUET. Pathologie chirurgicale.
 MOUQUIN Pathologie médicale.
 PETIT-DUTAILLIS... Pathologie chirurgicale.
 PIÉDELIÈVRE. Médecine légale.
 PORTES Obstétrique.
 RENARD Ophtalmologie.
 RICHTET Physiologie.
 SÉNÈQUE Pathologie chirurgicale.
 TURPIN Pathologie médicale.
 VIGNES Obstétrique.
 WILMOTH Pathologie chirurgicale.

III. — AGRÉGÉS RAPPELÉS A L'EXERCICE

POUR LE SERVICE DES EXAMENS.

MM.

ALGLAVE Pathologie chirurgicale.
 BUSQUET Pharmacologie.
 CHAILLEY-BERT... Physiologie.
 GUÉNIOT Obstétrique.
 HEITZ-BOYER . Pathologie chirurgicale.

MM.

LARDENNOIS . Pathologie chirurgicale.
 LE LORIER .. Obstétrique.
 NEVEU-LEMAIRE. Parasitologie.
 SCHWARTZ .. Pathologie chirurgicale.
 VAUDESCAL .. Obstétrique.

IV. — AGRÉGÉS CHARGÉS DE COURS DE CLINIQUE ANNEXE

A TITRE PERMANENT.

MM.		MM.	
ALAJOUANINE	} Clinique médicale.	BASSET	} Clinique chirurgicale.
AUBERTIN		BROCQ	
BRULÉ		CADENAT	
CHABROL		GATELLIER	
DONZELOT		MOURE	
DUVOIR		QUENU	
LIAN		VELTER	
PASTEUR-VALLERY- RADOT			
SÉZARY			

MM.	
ECALLE	} Clinique obstétricale.
METZGER	

V. — CHARGÉS DE COURS.

MM.	
CHAILLEY-BERT, agrégé	Éducation physique.
LEDoux-LEBARD	Radiologie clinique.
RUPPE	Stomatologie.
WEIL-HALLÉ	Puériculture.

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'École a arrêté que les opinions émises dans des dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A MON PÈRE

*dont l'esprit scientifique et la haute
valeur morale me sont un grand
exemple.*

A MA MÈRE

A MON FRÈRE GAËTAN-EDOUARD

PROFESSEUR AGRÉGÉ A LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE MARSEILLE

A MES FRÈRES ET A MA SŒUR

MEIS ET AMICIS

A MON MAÎTRE ET PRÉSIDENT DE THÈSE

M. LE PROFESSEUR M. POLONOVSKI

PROFESSEUR DE CHIMIE MÉDICALE

*dont l'érudition consommée se double
d'un enthousiasme créateur qu'il sait
communiquer à ses élèves,*

*Je dédie ce travail fait à son école
et sous sa direction, en le priant de
recevoir, avec mes profonds remercie-
ments, l'expression de mon respec-
tueux et fidèle attachement.*

A MON MAÎTRE

M. LE PROFESSEUR A. DESGREZ

PROFESSEUR HONORAIRE DE CHIMIE MÉDICALE

qui a guidé paternellement mes premiers pas dans le merveilleux domaine de la Chimie Biologique.

Expression de toute ma reconnaissance.

A M. LE DOCTEUR HENRI LABBÉ

PROFESSEUR AGRÉGÉ HONORAIRE DE CHIMIE MÉDICALE

A M. LE PROFESSEUR SANNIÉ

A M. LE PROFESSEUR J. ROCHE

PROFESSEUR DE CHIMIE MÉDICALE
A LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE MARSEILLE

A MES MAÎTRES

M. LE PROFESSEUR LOEPER

PROFESSEUR DE CLINIQUE MÉDICALE

M. LE PROFESSEUR CHEVASSU

PROFESSEUR DE CLINIQUE UROLOGIQUE

M. LE PROFESSEUR ROUVIÈRE

PROFESSEUR D'ANATOMIE

*Témoignage de ma profonde déférence
et de ma respectueuse gratitude.*

A M. LE DOCTEUR LIAN

PROFESSEUR AGRÉGÉ

MÉDECIN DE L'HÔPITAL TENON

A M. LE DOCTEUR P. E. WEIL

MÉDECIN DE L'HÔPITAL TENON

*en remerciement pour l'accueil bien-
veillant que j'ai trouvé dans leur ser-
vice.*

A MES MAÎTRES DANS LES HÔPITAUX
(Stage et Externat)

M. LE PROFESSEUR E. SERGENT

M. LE PROFESSEUR CUNEO

M. LE DOCTEUR L. RAMOND
MÉDECIN DE L'HÔPITAL LAËNNEC

M. LE PROFESSEUR CHEVASSU

M. LE PROFESSEUR LOEPER

M. LE PROFESSEUR HARVIER

CHAPITRE PREMIER.

Etude comparative de l'action catalytique des peroxydases végétales et de l'hémoglobine ⁽¹⁾.

Nous présentons dans cette étude une méthode de dosage de l'activité peroxydasique qui tient compte de la spécificité à l'égard du peroxyde et du substrat et du pH optimum de l'action de l'enzyme considéré. Elle est basée sur une mesure d'un temps et a une grande précision. Les résultats sont exprimés par le symbole U.I.a. et rapportés à 1 mg. de catalyseur. Les U.I.a. obtenus avec une peroxydase active et avec l'hémoglobine sont d'un ordre de grandeur comparable et le rapport des activités de ces catalyseurs tombe de 10.000 selon WILLSTÄTTER à moins de 100 quand on utilise la méthode que nous avons mise au point.

L'hémoglobine doit être considérée comme un enzyme peroxydasique, tant par sa spécificité relative et par son activité que par sa sensibilité à l'action de la température et du pH. Elle est une peroxydase moyennement active, dont le comportement est bien différent de celui des peroxydases végétales mais s'en rapproche beaucoup quand le système est complété par une substance réductrice dont le type le plus parfait est la vitamine C. L'hémoglobine répond à un système absolument différent de celui des peroxydases, car elle oxyde directement l'acide ascorbique, la cystéine et le glutathion et elle active les hydroperoxydes d'alcoyle environ 20 fois plus que l'eau oxygénée.

Ce système (1) s'oppose par sa spécificité à celui qu'a établi SZENT-GYÖRGYI dans le cas des peroxydases végétales (2).

(1) $ROOH-HbO_2$ —acide ascorbique.

(2) H_2O_2 —peroxydase—flavone—acide ascorbique.

(1) MAX JAYLE. — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1939, n° 1, page 14.

Les peroxydases sont des enzymes qui accélèrent l'oxydation d'un substrat par un peroxyde. Elles ont attiré l'attention des premiers biochimistes, qui leur attribuaient une grande importance physiologique. Mais au fur et à mesure que le groupe des enzymes d'oxydation s'enrichissait d'éléments nouveaux, leur importance a diminué et on les considère aujourd'hui comme une fraction accessoire des systèmes d'oxydation biologique. Au seuil de leur étude, nous situerons, dans la classification générale des enzymes d'oxydation, la place que leur confèrent tant leur rôle biologique que leur mécanisme d'action ; nous passerons en revue les différentes théories qui interprètent leur action biochimique et nous aborderons les méthodes de préparation et les méthodes de dosage de leur activité. Mais le but essentiel de notre travail est de les comparer à la première peroxydase découverte : l'hémoglobine (SCHÖNBEIN [81]) dont l'action catalytique a été l'objet de nombreux travaux contradictoires ; son état cristallisé et défini en fait le matériel de choix pour l'étude du mécanisme de l'action peroxydasique. Nous nous attacherons particulièrement à la recherche de la spécificité de ces enzymes, car il est important de savoir si on doit considérer comme définitive l'opinion de WILLSTÄTTER selon laquelle l'hémoglobine a une activité peroxydasique 10.000 à 30.000 fois inférieure à celle des peroxydases végétales.

PEROXYDASES VÉGÉTALES.

I. — Nomenclature.

Conformément aux règles générales de la nomenclature, on fera précéder le suffixe ase du nom de la substance activée. Les enzymes activant les peroxydes s'appelleront donc peroxydases. Plus spécialement, nous désignerons, sous le nom de Hydroperoxydases, ceux qui s'adressent au peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et Hydroalcoyloperoxydases ceux qui activent les hydroperoxydes d'alcoyle RO_2H .

Les peroxydases se rapprochent des oxydases, par leur définition même, les unes activant le peroxyde et les autres l'oxygène moléculaire. On sait que, pour WARBURG, les oxydases sont des métalprotéides ferrugineux, cupriques (ou manganiques pour G. BERTRAND) et sont localisées avec les peroxydases à la périphérie cellulaire. Elles se différencient par leurs inhibiteurs propres des déshydrases qui mobilisent l'hydrogène du substrat et sont à la base de la théorie de WIELAND. Mais peroxydases et oxydases peuvent être rattachées à ce dernier groupe d'autant

plus que, d'après BIGWOOD, ces inhibitions ne sont pas toujours si spécifiques et que le peroxyde ou l'oxygène qu'elles activent ne servent en fait que d'accepteurs à la molécule d'hydrogène du substrat. Cependant si les processus de l'oxydation consistent toujours en une déshydrogénation, la modalité en est variable selon l'enzyme. Avec la déshydrase, le temps préliminaire et essentiel de la réaction consiste à mobiliser les hydrogènes du substrat spécifique et l'accepteur importe peu ; alors que l'étude spectrographique nous montrera que, dans le cas de la peroxydase, le peroxyde joue un rôle actif dans le déclenchement de la catalyse. Il porte le fer à un état instable d'oxydation qui est responsable de l'action enzymatique. La désignation de ces enzymes est ainsi conforme à leur mécanisme d'action. Mais le rattachement des oxydases à l'un ou à l'autre groupe est un problème sur lequel l'accord n'est pas fait, les partisans de la théorie de WIELAND en faisant des enzymes qui sensibilisent le substrat à l'action de l'oxygène. Nous discuterons les arguments favorables à l'une ou l'autre de ces conceptions au jour des résultats que nous a apportés l'étude des peroxydases.

II. — Méthode de préparation.

Les peroxydases sont universellement répandues dans les tissus des végétaux. Certaines plantes en sont particulièrement riches et servent de matière première toute indiquée. Les racines de raifort, la poire, la pomme de terre, le radis noir, le navet, etc..., peuvent être employés. La méthode la plus ancienne consistait à les extraire par l'eau et à les précipiter de leur solution par un excès d'alcool ; elle fournit une préparation peu active. Nous avons utilisé pour nos préparations la méthode de WILSTÄTTER [104 a].

a) Préparation du produit brut.

On coupe en tranches de $1/2$ à 1 mm. d'épaisseur 5 kg. de racines de raifort qui ont séjourné dans l'eau pendant un jour et on les introduit dans un dialyseur plongé dans l'eau courante pendant 7 à 9 jours. Les racines fortement brunies sont retirées du dialyseur, essorées, et traitées pendant 4 à 5 heures par 10 litres d'eau contenant 40 g. d'acide oxalique cristallisé afin de précipiter l'enzyme dans le tissu. La suspension est agitée pendant 2 heures. Les racines sont alors essorées, fortement exprimées, et broyées dans un moulin afin d'en obtenir une purée très fine ; celle-ci est malaxée dans 6 à 8 litres d'eau, filtrée sur

un linge et lavée avec 6 à 8 litres d'une solution à 1 p. 1.000 d'acide oxalique. Les racines emballées dans un double linge sont exprimées sous une presse (leur poids est alors de 1 kg. et demi). On les traite par 1 litre 1/3 à 1 litre 1/2 d'eau de baryte saturée, ce qui colore les fibres en jaune. Après les avoir broyées et pétries pendant une demi-heure, on obtient un premier extrait peu actif et le résidu est exprimé sous une presse de BUCHNER. On le reprend par un litre un quart d'eau de baryte saturée en le traitant comme précédemment. La même opération est répétée deux ou trois fois et les extraits obtenus sont traités par le gaz carbonique jusqu'à réaction acide ; on les additionne des 9/10 de leur volume d'alcool à 95 p. 100. Les peroxydases restent en solution et les extraits sont gardés une nuit à la glacière. Le lendemain on décante et on centrifuge. L'enzyme est alors précipité par addition de 5 volumes d'alcool absolu. Le précipité formé est pulvérisé par broyage dans de l'alcool et filtré. Par une série de solubilisations et de précipitations on obtient une poudre dont l'activité exprimée en P.Z. (1) peut atteindre 600.

b) Purification par adsorption.

La purification de l'enzyme se fait par adsorption sur l'hydroxyde d'alumine dans de l'alcool à 50 p. 100. Une suspension d'alumine (10 à 15 g. dans 400 à 500 cm³ d'eau) est introduite par petites portions de 20 à 30 cm³ toutes les 2 ou 3 minutes dans l'extrait alcoolique à 50 p. 100. On agite continuellement et on s'assure que l'adsorption est totale en centrifugeant une prise d'essai et en effectuant la réaction au pyrogallol. Une quantité d'alcool correspondant à la solution d'alumine est alors ajoutée et on laisse le précipité se déposer pendant quelques heures. On centrifuge, et l'alumine, reprise par 3 ou 4 litres d'eau, est traitée par un courant de CO₂. On concentre à 25-30° jusqu'à 150 cm³ et l'on précipite la peroxydase par l'alcool comme il est indiqué ci-dessus. Des préparations, dont l'activité évaluée en P.Z. peut atteindre 1.000 à 3.000, sont ainsi obtenues.

La méthode d'ELLIOTT [29] consiste à précipiter l'enzyme par du sulfate d'ammoniaque à saturation. Elle a l'avantage d'être simple et rapide mais livre une préparation beaucoup moins active.

(1) Voir page 18.

III. — Recherche qualitative des peroxydases.

On fait agir de l'eau oxygénée sur la solution d'une substance oxydable en présence de la peroxydase. On peut utiliser comme substrat :

- 1° Une monoamine : L'aniline et ses dérivés, la paratoluidine etc..
- 2° Une diamine : o. m. p. phénylène-diamine, diméthylparaphénylène diamine, benzidine etc...
- 3° Un phénol : le phénol, le thymol, l'o. m. p. crésol.
- 4° Un diphénol : pyrocatéchol, gaïacol, résorcinol, hydroquinone, orcinol, pyrogallol, phloroglucinol.
- 5° Un acide aromatique : acide benzoïque, acide salicylique, acide pyrocatéchique, acide gallique.
- 6° Un leucodérivé d'une matière colorante : leucovert de malachite, phénolphtaléine réduite (MEYER).
- 7° Une substance biologique plus complexe comme l'adrénaline, une flavone, la tyrosine, le tryptophane.

Par contre, formiate, acétate, oléate, stéarate, glucose, glycérine, acétaldéhyde, lactate, histidine, ne sont pas oxydés.

IV. — Dosage de l'activité peroxydasique.

Les méthodes quantitatives les plus fréquemment utilisées sont la méthode de WILLSTÄTTER et STOLL [104] basée sur l'oxydation du pyrogallol en purpurogalline et la méthode de BACH et ZUBKOWA [2] basée sur l'oxydation du gaïacol.

1° Méthode de WILLSTÄTTER [104 a et b].

Dans deux litres d'eau à 20°, introduits dans un ballon plongé dans un bain à température constante, on dissout 5 g. de pyrogallol. On ajoute 10 cm³ de H₂O₂ à 5 p. 100 contenant exactement 50 mg. de H₂O₂ et la peroxydase (0,25 mg. d'une préparation moyenne par exemple ou 0,02 mg. d'une poudre active sous forme de 1 à 5 cm³ d'une solution de 5 mg. d'enzyme dans 100 à 500 cm³ d'eau). La solution jaunit aussitôt : au bout de 5 minutes la réaction est arrêtée par addition de 50 cm³ de SO₄H₂ à 10 p. 100. On épuise la purpuragalline 3 à 4 fois avec de l'éther et on effectue le dosage colorimétriquement par comparaison avec une solution étalon contenant dans 1 litre d'éther 100 mg. de purpurogalline recristallisée à partir d'un mélange alcool-éther. La quantité de purpurogalline formée est proportionnelle à la quantité d'enzyme. La quantité de catalyseur utilisée est telle que 15 à 25 mg. de purpurogalline soient obtenus au bout de 5 minutes. L'activité est évaluée en P. Z. (Purpuro-

gallin-Zahl) qui est la quantité de purpurogalline formée en 5 minutes par un mg. de l'enzyme..

Beaucoup d'auteurs utilisent des fractions des quantités ci-dessus indiquées, soit par exemple : 400 cm³ d'eau, 1 g. de pyrogallol et 10 mg. de H₂O₂. BANSI et UCKO [4] se servent, comme étalon colorimétrique, d'une solution d'acide chromique à 0,57 p. 1000 qui correspond à une solution de purpurogalline de 0.1 p. 1.000.

2° Méthode de BACH modifiée par BANSI et UCKO [12 G].

Elle est basée sur l'oxydation du gaïacol en tétragaïaquinone (G. BERTRAND). Ce substrat a sur le précédent l'avantage considérable d'être soluble dans l'eau à l'état oxydé et de ne pas être autooxydable sous sa forme réduite. BANSI et UCKO ont modifié la méthode de BACH afin de se placer dans les conditions expérimentales de la méthode de WILLSTÄTTER.

5 cm³ de gaïacol à 1 p. 100 sont ajoutés à 400 cm³ d'eau à 20°. On introduit 1 cm³ de H₂O₂ à 1 p. 100 et la solution de l'enzyme. La réaction est arrêtée au bout de 5 minutes, par addition de 10 cm³ de sublimé à 5 p. 100 à 20 cm³ de la solution prélevés à la pipette. La mesure colorimétrique doit être faite dans le quart d'heure qui suit, afin d'éviter le virage de la teinte. Le test colorimétrique est une solution de nitrate de cobalt à 10 p. 100, à 50 cm³ de laquelle on ajoute 1,2 cm³ de bichromate de potassium à 5 p. 100. On dilue cette solution au 1/10° (A) au 1/5° (B) ou au 1/2,5° (C) et l'égalisation des teintes est faite en fixant la hauteur du témoin à la graduation 10 du colorimètre de DUBOSCQ. La quantité de gaïacol est donnée par les courbes empruntées au travail de BANSI et UCKO [12 c] (Figures 1, 2, 3) qui donnent en mg. la quantité de gaïacol en fonction de la hauteur de la solution à doser après égalisation des teintes au colorimètre de DUBOSCQ selon que l'on emploie la solution témoin A, B, C.

D'autres matières colorantes peuvent être utilisées : le crésol, (BANSI-UCKO [12 c] la leucobase du vert de malachite, R. WILLSTÄTTER et H. WEBER [103]).

3° Méthode photométrique.

La coloration de la solution de purpurogalline peut être évaluée photométriquement (Bosson [18]).

4° Méthode gravimétrique.

On peut déterminer par pesée directe la quantité de substrat oxydé.

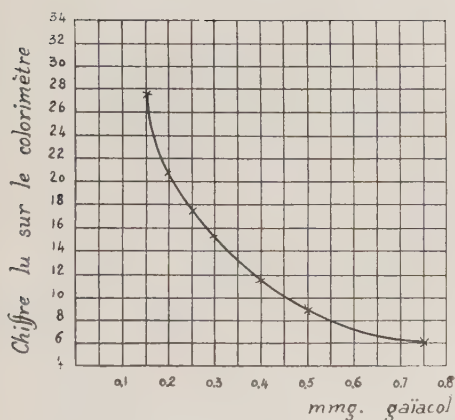


FIG. 1.

Quantité de gaïacol oxydé en mmg. en fonction de la lecture au colorimètre DUBOSCQ (solution étalon A).

(D'après H. W. BANSI et H. UCKO).

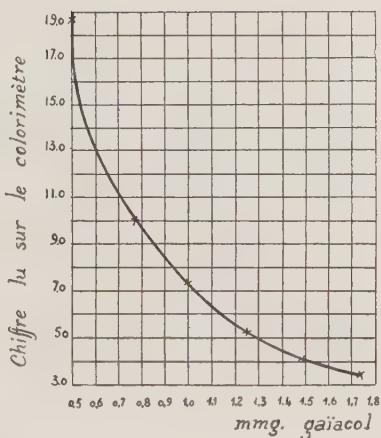


FIG. 2.

Quantité de gaïacol oxydé en mg. en fonction de la lecture au colorimètre DUBOSCQ (solution étalon B).

(D'après H. W. BANSI et H. UCKO).

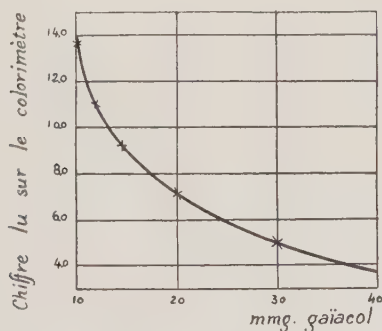


FIG. 3.

Quantité de gaïacol oxydé en mg. en fonction de la lecture au colorimètre DUBOSCQ (solution étalon C).

(D'après H. W. BANSI et H. UCKO).

5° Méthode spectrographique.

CZYHLARTZ et FÜRTH [24] déterminent spectrographiquement la quantité de vert de malachite produite à partir de sa leuco-base.

6° Méthode potentiométrique.

Elle a été mise au point par M. V. SITHARAMAN et S. RENGACHARI [84], l'hydroquinone étant le substrat oxydable. Les mesures sont faites en présence d'un excès de quinhydrone et on détermine avec une erreur inférieure à 1 p. 100 la quantité qui est oxydée par le système.

7° Méthode volumétrique.

La méthode basée sur l'activation par une peroxydase de l'action d'un peroxyde sur l'acide iodhydrique nous arrêtera plus longuement (KUHN et BRANN [56]).



Une telle réaction évolue rapidement au dessous de pH 2,5 et de plus en plus lentement à mesure que le pH augmente. Ainsi à pH 3 et à 20°, 0,55 cm³ iode N/100 sont libérés en 5 minutes alors qu'à pH 2 tout le peroxyde introduit est utilisé dans le même temps. Nous nous sommes servis au cours de notre travail de la méthode de WOLFF et STOECKLIN [105] que nous avons légèrement modifiée.

Dans une capsule plongeant dans un thermostat, réglé à 23°, on introduit successivement 10 cm³ d'une solution tampon de citrate M/20, 3 cm³ iodure M/10, 5 gouttes d'empois d'amidon à 5 p. 100, la solution de l'enzyme et 1 cm³ de peroxyde N/10. On commence au bout de 4 minutes 1/4 à titrer l'iode libéré par de l'hyposulfite N/100 de façon à terminer la titration à 5 minutes exactement. On rapporte par le calcul le chiffre obtenu, soit à 1 mg. de catalyseur, soit à un volume déterminé de la solution peroxydasique et on obtient ainsi une unité conventionnelle que l'on représente par le symbole U. I. Cette méthode est simple, mais n'est précise que dans le cas ou de petites quantités de catalyseur sont employées, de façon que U. I. reste expérimentalement inférieur à 5. On conçoit facilement que si la libération d'iode est trop rapide, non seulement les conditions expérimentales ne sont plus les mêmes à la fin du dosage, mais encore il devient impossible de titrer exactement l'iode libéré. Cette méthode par dosage direct a le grave inconvénient de soumettre le catalyseur à l'action de l'iode naissant dont on connaît l'effet nocif. Mais des erreurs beaucoup plus importantes résulteraient du dosage de l'iode au fur et à mesure de sa libération, car un léger excès d'hyposulfite aurait une action inhibitrice sur la marche du catalyseur, et l'action nocive de l'iode ne serait pas évitée. Ce sont les raisons pour lesquelles nous avons mis au point une méthode de dosage en retour de l'iode libéré.

8° Méthode indirecte de dosage de l'iode libéré par un système Peroxyde-Peroxydase-IH.

On introduit dans une capsule plongeant dans un bain à 23° ($\pm 1^{\circ}$) et muni d'un système d'agitation mécanique (figure 4) $0,5 \text{ cm}^3$ de la solution de peroxydase, 3 cm^3 IK M/10, $0,5 \text{ cm}^3$ d'acide ascorbique N/10 dosé par une solution d'iode N/10. Dans un tube à essai, on met 10 cm^3 d'une solution de citrate M/20 au pH optimum du système, 1 cm^3 de peroxyde N/10 et 3 gouttes d'empois d'amidon, le tout à la température de 23° . L'agitateur étant en mouvement, on introduit rapidement le contenu du tube à essai dans la capsule en mettant en marche

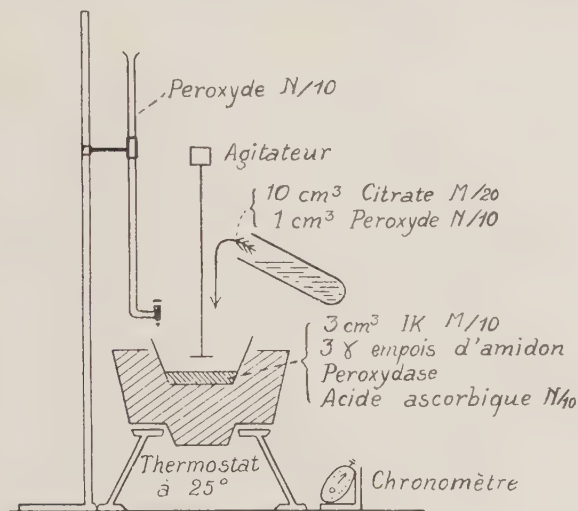


FIGURE 4.

au même instant un chronomètre. On note le temps d'apparition de la coloration bleue qui se produit quand l'acide ascorbique est totalement oxydé par l'iode libéré. La quantité de catalyseur est calculée de façon que ce temps soit compris entre 25 et 40 secondes. Prenons comme exemple le cas où la coloration au cours de ce premier essai apparaît au bout de 30 secondes : C'est le temps au bout duquel l'acide ascorbique N/10, introduit ($0,5 \text{ cm}^3$) est oxydé. Dans un deuxième essai on introduit la même quantité de catalyseur et 2 cm^3 d'acide ascorbique N/10 ; la quantité initiale de peroxyde (1 cm^3) étant insuffisante, on ajoutera goutte à goutte, entre 30 secondes et 2 minutes, $1,5 \text{ cm}^3$ de peroxyde N/10, de façon à en maintenir à peu près constante la concentration : le débit de la burette sera réglé de façon que $0,1 \text{ cm}^3$

de peroxyde N/10 soit introduit toutes les 6 secondes ; en effet, dans le cas particulier, $0,5 \text{ cm}^3$ de peroxyde N/10 est utilisé par le système en 30". Dans les essais suivants, on fait varier les quantités d'acide ascorbique de façon à obtenir un temps d'apparition de la coloration bleue compris entre deux et trois minutes et un autre entre 3 et 4 minutes. On évalue graphiquement la quantité d'iode N/100 libérée par le système au bout de 3 minutes en portant en abscisse les temps et en ordonnée l'acide ascorbique oxydé par l'iode libéré (figure 5).

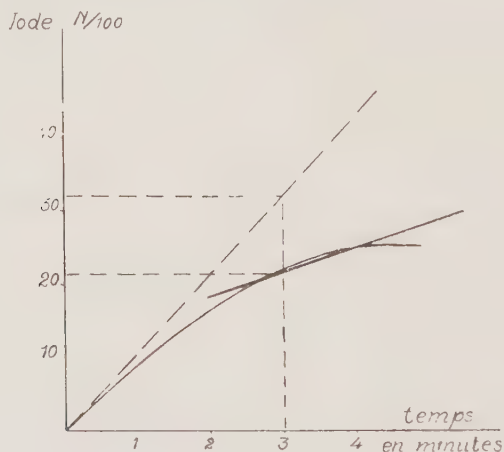


FIGURE 5.

Détermination de « U.I.a ».

Cette méthode est simple, rapide, et très précise. Elle a l'avantage de permettre l'étude de la cinétique du système peroxydasique. Deux cas peuvent se présenter (fig. 5) : l'activité peroxydasique s'inscrit linéairement selon une droite ou au contraire elle diminue progressivement et la courbe tend vers une asymptote.

On exprime l'activité du système en Unités d'Iode titrées en présence d'acide ascorbique. Le symbole U. I. a représente la quantité d'iode N/100 libéré par le système au bout de 3 minutes. On ramène par le calcul cette quantité à 1 mg. du catalyseur utilisé ou à un volume déterminé de sa solution.

Les résultats obtenus avec ces différentes méthodes ne concordent pas toujours, mais dépendent de la peroxydase utilisée. Une préparation brute de peroxydase donne avec le pyrogallol des chiffres qui sont de 5 à 15 p. 100 plus forts que ceux que l'on obtient avec le gaïacol. Après purification, la différence atteint 50 p. 100 (BANSI et UCKO [12]). Le tableau I montre que dans le cas de la peroxydase du raifort, les P. Z. (H_2O_2) sont en-

viron de 30 p. 100 supérieurs aux U.I.a. (H_2O_2). La différence est de 50 p. 100 en faveur des P. Z. avec les peroxydases du navet et du radis noir. Dans le cas de la peroxydase du lait les chiffres concordent à peu près.

V. — Activation comparée du peroxyde d'hydrogène et des hydroperoxydes d'alcoyle par les peroxydases.

Des différences très importantes sont en rapport avec le peroxyde utilisé. Nous avons comparé l'activation de l'eau oxygénée à celle des hydroperoxydes d'alcoyles de formule générale ROOH.

L'eau oxygénée N/10 est préparée par dilution de la solution commerciale.

Nous avons préparé les hydroperoxydes d'éthyle et de méthyle (C_2H_5OOH , CH_3OOH) par la méthode de BAEYER et VILLIGER [10].

Dans un ballon, muni d'un système à agitation continue, on introduit 100 g. de sulfate d'éthyle et 340 g. d'eau oxygénée à 10,8 p. 100 et on laisse tomber goutte à goutte 345 g. d'une solution de potasse à 42 p. 100. L'agitation est poursuivie jusqu'à ce qu'une prise d'essai épuisée par l'éther ne contienne plus de sulfate d'éthyle. La réaction est presque complète dans les 2 ou 3 premières heures entre 15 et 20°, mais elle n'est complètement terminée qu'au bout de 10 heures d'agitation. On acidifie légèrement la solution avec de l'acide sulfurique et on distille sur bain d'huile jusqu'à ce que le distillat n'oxyde plus l'acide iodhydrique. L'hydroperoxyde d'éthyle passe avec l'alcool et l'eau entre 90 et 100°. Le rendement est de 50 p. 100 environ. Pour éloigner l'alcool on ajoute au distillat un excès de potasse et on le réduit dans le vide à 30° jusqu'au tiers de son volume. L'hydroperoxydase est retenu en arrière grâce à ses propriétés légèrement acides. La solution est à nouveau acidifiée et le peroxyde est distillé dans le vide entre 30 et 60°. On peut le précipiter de sa solution en la saturant par du sulfate d'ammoniaque.

Nous avons opéré de la même façon pour préparer l'hydroperoxyde de méthyle en partant du sulfate neutre de méthyle.

MÉTHODE DE DOSAGE DU PEROXYDE.

Le dosage est effectué par la méthode iodométrique. On introduit dans une capsule 1 cm³ de peroxyde, 2 cm³ d'iodure à 20 p. 100, 0,5 cm³ d'acide sulfurique 5 N. L'iode libéré est dosé après 5 minutes dans le cas de H_2O_2 , après quatre heures dans celui de ROOH par de l'hyposulfite N/10. La solution est rame-

née par dilution au titre N/10 qui est vérifiée par un dosage de contrôle.

TABLEAU I.

Activité de différentes préparations de peroxydases végétales exprimées en chiffres de purpurogallines (PZ) et en activité d'iode (U.I.a et U.I.).

Enzyme 1 mg.	PZ H_2O_2	PZ $\text{C}_2\text{H}_5\text{OOH}$	U.I.a H_2O_2	U.I.a $\text{C}_2\text{H}_5\text{OOH}$	U.I.a CH_3OOH	U.I. H_2O_2	$\frac{\text{U.I.a}}{\text{U.I. tém.}}$ H_2O_2	$\frac{\text{U.I.a}}{\text{U.I. tém.}}$ $\text{C}_2\text{H}_5\text{OOH}$	$\frac{\text{U.I.a}}{\text{U.I. tém.}}$ CH_3OOH
Raifort.....	330	80	260	70	24	260	722	777	138
Radis noir.....	48	5,2	24	5	1,9	24	66	55	10
Navet.....	28	.7	12.2	2,6	0,7	12,2	33	29	3,8
HbO ₂ Cheval 23°	0,152 (1)	0,10 env.	1,02	4,7	6	1,2	2,8	52	33

Le tableau I évalue les activités catalytiques de diverses préparations de peroxydases en P. Z. et en U.I.a. suivant que l'on utilise ROOH ou H_2O_2 . Les U.I.a. $\text{C}_2\text{H}_5\text{OOH}$ sont environ le quart des U. I. a. H_2O_2 . Cependant l'activation de l'hydroperoxyde d'éthyle est appréciable ; elle ressort encore plus nettement de la comparaison des coefficients d'activation de la réaction que nous mesurons par le rapport de l'iode libéré par la réaction catalysée (U. I. a.) à l'iode libéré dans les mêmes conditions et pendant le même temps par le témoin sans peroxydase : $\frac{\text{U. I. a.}}{\text{U. I. tém.}}$.

(3 minutes) U. I. tém. H_2O_2 = 0,36 U. I. tém. $\text{C}_2\text{H}_5\text{OOH}$ = 0,09 U. I. tém. CH_3OOH = 0,18] Les coefficients d'activation sont dans le cas de la peroxydase du raifort de 722 pour l'eau oxygénée, de 777 pour l'hydroperoxydase d'éthyle et de 138 pour le peroxyde de méthyle. Il en ressort que ce dernier n'est que faiblement activé par les peroxydases végétales.

VI. Influence des réducteurs, du pH et de la température sur la réaction peroxydasique.

Nous avons recherché si le réducteur influe sur l'activation de la réaction et nous avons substitué à l'acide ascorbique dans le dosage indirect de l'iode libéré une solution de même titre de glutathion, de cystéine, d'hyposulfite, de sulfite, d'hydrosulfite.

La figure 6 exprime la quantité d'iode libérée en fonction du temps. Elle montre que la vitesse de la libération de l'iode est la même en l'absence de réducteur comme en présence d'acide

(1) R. WILLSTÄTTER et A. POLLINGER [102].

ascorbique, de glutathion, de cystéine, ou d'hyposulfite de soude. On a donc :

$$U. I. a. = U. I.$$

Ces réducteurs n'influent pas sur la réaction peroxydasique ; cependant en présence d'hyposulfite, la vitesse diminue rapidement pour s'annuler au bout de 2 à 3 minutes. Il s'agit d'un arrêt de la réaction par destruction de catalyseur sous l'influence combinée de l'hyposulfite et du peroxyde. Ces deux substances

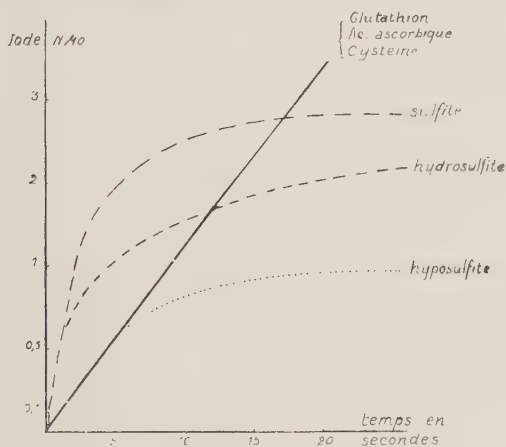


FIGURE 6.

Influence des réducteurs sur le système : H_2O_2 —Peroxydase—IH.

sont séparément sans action sur l'enzyme, même après un temps de contact d'une heure ; mais il suffit de les mélanger pour détruire rapidement la peroxydase qui est sensibilisée par l'hyposulfite à l'action oxydante du peroxyde. Le même phénomène s'observe avec les autres réducteurs minéraux (sulfite, hydrosulfite). Mais dans ce cas la vitesse de la réaction est considérablement augmentée au début et comme le montre la figure 6 la coloration bleue apparaît presque instantanément tant que le catalyseur n'est pas détruit.

Nous avons vérifié que dans le système H_2O_2 — peroxydase — IH — acide ascorbique, l'acide iodhydrique est bien le substrat oxydable, l'iode libéré jouant le rôle d'oxydant intermédiaire de la vitamine C. Dans la technique indiquée ci-dessus on remplace les 3 cm³ d'iode M/10 par 3 cm³ d'eau distillée et on constate que, en dosant l'acide ascorbique toutes les minutes dans des échantillons différents, son oxydation catalysée par la peroxydase est très faible. Ces résultats confirment ceux de SZENT-GYÖRGYI [36] et de St. HUSZAK [19] qui établissent que le jus de fruit contient une substance permettant l'oxydation de

l'acide ascorbique par l'eau oxygénée en présence de peroxydase. Il s'agit de substances flavoniques qui sont oxydées par le système peroxydasique en dérivés quinoniques et ceux-ci transforment l'acide ascorbique en acide déhydroascorbique. L'acide iodhydrique joue dans la réaction de notre dosage le rôle de ces flavones dans les systèmes d'oxydation des végétaux. D'une façon générale, les peroxydases n'oxydent pratiquement pas les réducteurs biologiques ou minéraux que nous avons utilisés.

ACTION DU pH SUR LA RÉACTION.

Le pH optimum dépend de la peroxydase. Il est situé dans le cas de IH, à 3,7-4 pour les peroxydases végétales du raifort, du navet et du radis noir et 4,6 pour la peroxydase du lait. BANSI et Ucko [12 d] ont montré que le pH optimum dépend pour une même peroxydase du substrat utilisé : il est situé, pour la peroxydase du raifort, entre 4,5 et 6,5 dans le cas du gaïacol, entre 3,5 et 5 dans celui du crésol et 6,5-7 dans le cas du pyrogallol. Pour l'acide iodhydrique, il peut être déterminé avec beaucoup plus de précision et se situe entre 3,5 et 4, en présence comme en absence de réducteurs. Le citrate monosodique M/20 (pH 3.7) constitue un milieu de choix.

ACTION DE LA TEMPÉRATURE.

La figure 7 indique que l'optimum de température est situé entre 30 et 40°. A ce niveau l'activité de l'enzyme marque un plateau, de part et d'autre duquel on observe une diminution progressive. La température mortelle oscille suivant la peroxydase entre 80 et 90°.

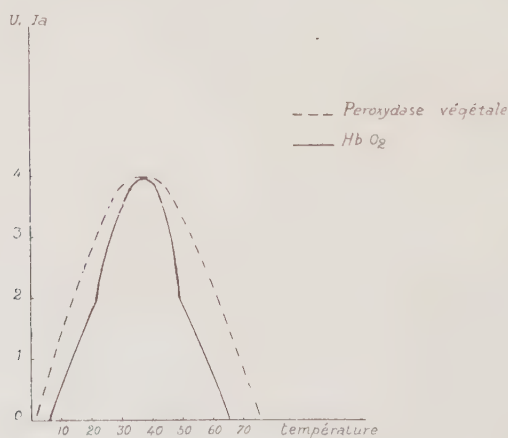


FIGURE 7.
Température optimum.

VII. — Constitution des peroxydases,

Le rôle du fer dans les peroxydases a donné lieu à beaucoup de travaux contradictoires. Selon WOLFF [105], le fer joue un rôle essentiel mais E. DE STOECKLIN [89] obtient des peroxydases presque exemptes de fer. R. WILLSTÄTTER et STOLL [104 b] trouvent un parallélisme entre l'activité des préparations brutes et leur taux en fer ; mais ce rapport n'existe plus après une purification par adsorption ; dans le cas d'une de leur préparation très active ils trouvent 0,065 Fer p. 100 pour une peroxydase de P.Z. = 3070, alors que la même préparation non purifiée avait une teneur en Fe de 0,17 p. 100 et un P.Z. égal à 300. Pour R. KÜHN, D. B. HAND et M. F. FLORKIN [57], ainsi que pour K. C. ELLIOTT et K. KEILIN [29] il y a une relation indiscutable mais non pas un rapport simple entre la contenance en hématine et l'activité de la préparation. R. ITO [49], J. B. SUMMER et S. F. HOWELL [90] considèrent la peroxydase comme un complexe protéine-porphyrine ferrugineuse. D. KEILIN et T. MANN [44] montrent que la peroxydase du raifort donne une coloration rouge brun en solution légèrement acide et que le spectre est celui de la protohématine. Ces résultats confirment les travaux de F. AXMACHER et H. OELBRACHT [5] qui comparent l'action du ferrocyanure, du ferricyanure et du sulfocyanure sur deux préparations de peroxydase, l'une étant 17 fois plus active que l'autre et constatent que les inhibitions sont du même ordre de grandeur ; il en est de même pour les concentrations actives de la pyridine ou de la nicotine qui augmentent l'action catalytique de ces enzymes.

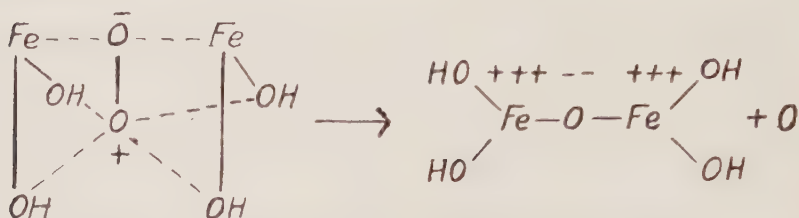
Il y a donc tout lieu de croire que la fraction active de la peroxydase végétale est le plus souvent une porphyrine ferrugineuse dont la constitution est voisine de celle de la protohématine. Il est cependant vraisemblable qu'il en existe d'autres dont la constitution n'est pas encore définie.

VIII. — Mécanisme des actions oxydasiques et peroxydasiques,

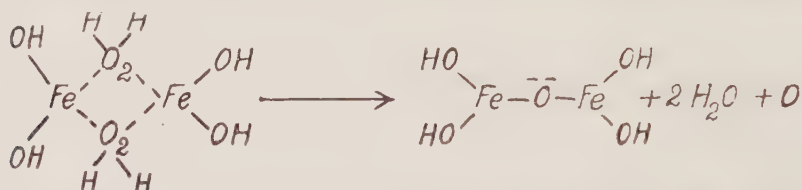
Le fer est le plus souvent la fraction active des oxydases vraies et des peroxydases. Aussi l'étude de la catalyse d'oxydation par l'ion ferreux permet-elle de se faire une idée du fonctionnement de ces enzymes.

Selon A. JOB [50], cette catalyse serait liée à des changements d'électrovalence du fer. L'oxygène moléculaire se fixant sur deux molécules d'hydroxyde ferreux donnerait naissance à un peroxyde de formule Fe_2O_4 . Un transport interne des électrons, des atomes de fer sur la molécule d'oxygène amènerait la libération de l'atome d'oxygène neutralisé alors que l'atome négatif porteur

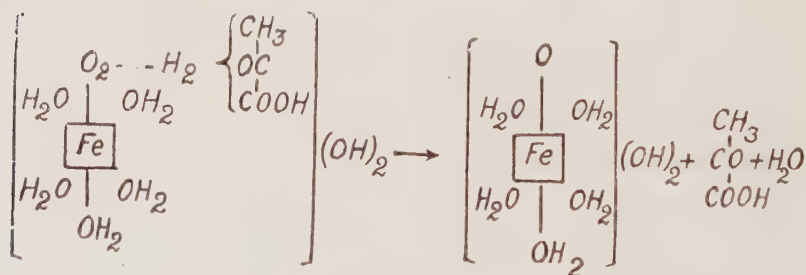
d'une double charge deviendrait le pont jeté entre les deux fers trivalents :



Ce schéma peut être adapté au cas particulier des peroxydes. Il représente l'activation de l'oxygène ou du peroxyde en rapport avec sa transformation en atome neutre.



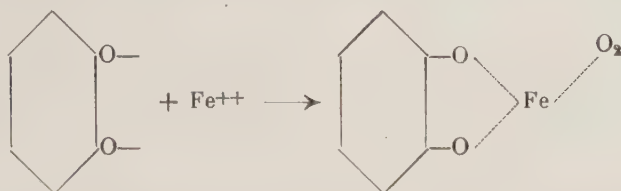
BAUDISCH et WELO [15 a] expliquent la catalyse par la formation d'un complexe de coordination, l'oxygène se fixant sur le fer et servant de point de liaison entre celui-ci et le substrat. Le transfert interne d'électrons amène la scission du complexe coordinatif en libérant le fer et le substrat sous une forme oxydée. Ce schéma a l'avantage d'expliquer en même temps la transformation de l'acide lactique en acide pyruvique et la réduction des nitrates en nitrites par les mêmes sels ferreux. L'eau oxygénée formerait des complexes de même nature.



Dans les deux cas, l'oxygène porte en lui les premiers germes d'oxydation, étincelle qui va déclencher le processus catalytique. A fortiori le peroxyde représente le premier stade de l'activation étant déjà par lui même un oxydant actif.

Mais SZENT-GYÖRGYI [92 b] pense que le temps essentiel de la formation du complexe de coordination est l'addition, sur le fer

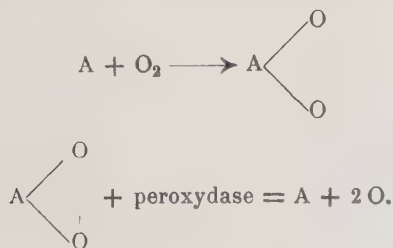
ou le cuivre, du substrat qui présente une structure spécifique avec deux oxhydriles en ortho ; le fer lié coordinativement devient le sommet d'un cycle pentagonal sur lequel la molécule d'oxygène s'additionne.



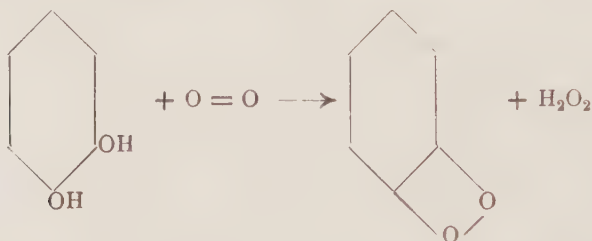
Dans un tel schéma le fer activé catalyse le transfert d'électrons de l'orthodiphénol sur l'oxygène qui joue le rôle d'un simple accepteur passif des électrons véhiculés. L'oxygène chargé de deux ou quatre électrons se neutralise au contact des ions positifs de l'eau. Cette théorie considère l'oxygène comme un gaz inerte et la propriété essentielle du catalyseur serait de lier coordinativement le donneur et l'accepteur d'électrons. Il en résulterait que oxydases et déhydrases seraient des enzymes de même structure faisant partie d'un même groupe et que les peroxydases formeraient un groupe isolé ; car, dans les systèmes peroxydasiques, l'action du peroxyde sur le catalyseur précède la transformation du substrat qui est l'élément passif.

IX. — Rôle biologique des peroxydases,

BACH et CHODAT [7], ENGLER [30] frappés par la coexistence quasi constante des peroxydases et des oxydases ont conclu au synergisme de leur action biologique. Ils ont réussi à séparer, par précipitation alcoolique fractionnée, la partie oxydasique de la partie peroxydasique et ont observé que cette séparation inactivait l'une et l'autre. Ils montrèrent que la fraction oxydasique incapable d'oxyder les substances phénoliques retrouvait son activité après addition de la fraction peroxydasique. Pour ces auteurs l'oxygène de l'air se fixait dans un premier temps sur l'oxydase en formant un peroxyde qui était ensuite activé par la peroxydase :



La peroxydase représentait donc le catalyseur essentiel des systèmes d'oxydation des végétaux et l'oxygène moléculaire était activé par clivage en deux atomes d'oxygène. J. WOLFF, N. RONCHELMAN [107] et ONSLOW [73] ont montré que dans les tissus des labiées, des composées, des solanées etc..., il était possible de séparer la peroxydase de la substance fixant l'oxygène, qui est un dérivé catéchique ayant deux oxhydriles en ortho. La fixation d'oxygène catalysée par l'oxydase aboutirait à la formation d'eau oxygénée suivant la réaction :



L'eau oxygénée ainsi formée serait ensuite activée par la peroxydase. Ainsi avant la découverte de la déhydrase, base biologique de la théorie de WIELAND, la formation d'un peroxyde était considérée comme le premier stade de l'activation de l'oxygène et à l'enzyme peroxydasique était attribué le rôle essentiel dans les processus oxydatifs. Plus tard, SZENT-GYÖRGYI montre que le pyrocatechol est autooxydé en une dicétone qui agit sans l'intervention de la peroxydase sur le substrat oxydable. Et à la théorie de BACH et CHODAT n'était plus attribué qu'un simple intérêt historique quand WIELAND établit que la déhydrase constitue la pièce essentielle des systèmes d'oxydation cellulaire. Deux théories, celle de WIELAND et celle de WARBURG développent deux points de vue opposés. Selon WIELAND l'oxydation cellulaire est entièrement liée à des processus de déshydrogénation alors que pour WARBURG, c'est l'activation de l'oxygène par les systèmes oxydasiques qui en est la phase essentielle. KEILIN et SZENT-GYÖRGYI représentent un système d'oxydation cellulaire comme étant composé par une longue chaîne de systèmes enzymatiques qui d'un côté véhiculent en cascade l'hydrogène libéré du substrat et de l'autre activent par étapes progressives l'oxygène moléculaire. La réaction finale va donner naissance soit à une molécule d'eau, soit à une molécule d'eau oxygénée.

La formation de l'eau oxygénée est catalysée par l'indophénoloxydase dont l'élément actif est le cuivre ou encore par le ferment jaune de WARBURG. Mais de l'eau oxygénée peut se produire spontanément quand l'oxygène sert directement d'accepteur à l'hydrogène activé par une déhydrase (THURLOW [95]) tel-

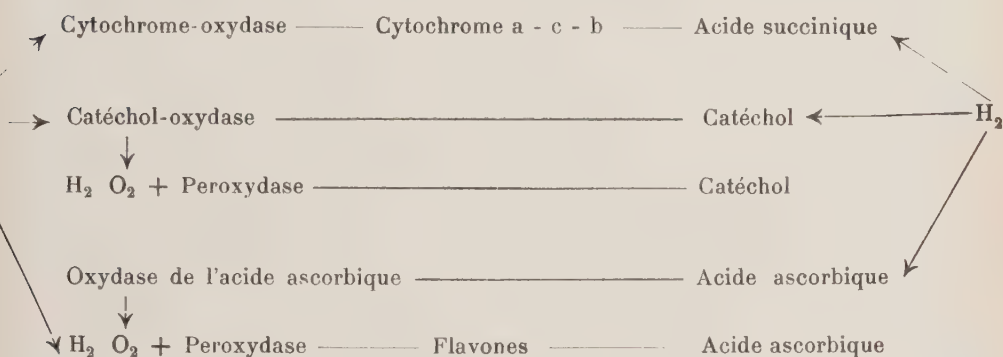
le que la xanthine-déshydrase du lait par exemple. La molécule de H_2O_2 ainsi formée va pouvoir subir deux évolutions différentes, elle pourra être détruite par une catalase avec libération d'oxygène moléculaire inactif :



Ou bien elle sera activée par une peroxydase pour oxyder par l'intermédiaire d'une flavone, un accepteur d'hydrogène tel que l'acide ascorbique ou le catéchol et la réaction devient :

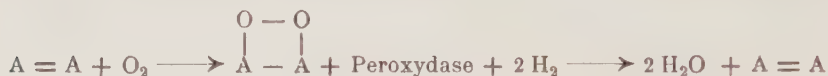


Le schéma suivant objective le rôle biologique des peroxydases végétales comme le conçoit SZENT-GYÖRGYI [35].



Cependant on ne peut s'empêcher d'observer que ces systèmes d'oxydation biologique ne tiennent pas compte de l'existence dans les tissus végétaux de substances auto-oxydables qui forment des peroxydes en additionnant l'oxygène moléculaire. L'expérience selon laquelle l'essence de térébenthine vieillie donne par agitation à l'air un peroxyde qui oxyde la teinture de gaïac en présence de peroxydase reste toujours vraie, ARAKAWA [3] a montré que les substances telles que la digitale, la valériane, la cantharide etc... donnent lieu en présence d'air à la formation de peroxyde. On sait également que les substances appartenant au groupe des terpènes sont très répandues dans le règne végétal et ont la propriété de donner facilement naissance à des peroxydes. ENGLER et WEISSBERG [30] réussirent à préparer un peroxyde de fulvène. MOORE et WHITLEY [66] montrent le caractère non saturé des substances autooxydables des plantes. B. H. GALLAGHER [38] étudie la formation des peroxydes à partir des tannins de la betterave (*Beta vulgaris*) et le même auteur établit que la lécithine est responsable de la formation de peroxyde par le jus de pomme de terre.

Tous ces faits permettent de penser que si le peroxyde d'hydrogène peut prendre naissance d'une façon secondaire au cours des processus d'oxydo-réduction cellulaires, on ne peut exclure la formation directe de peroxyde organique par fixation de l'oxygène sur une liaison non saturée d'une substance auto-oxydable suivant la réaction :



ACTION PEROXYDASIQUE DE L'HÉMOGLOBINE.

SCHÖNBEIN [81] a montré le premier que l'hémoglobine avait la propriété d'activer l'eau oxygénée. De nombreux auteurs se sont attachés à différencier l'action de l'hémoglobine de celle d'une peroxydase végétale. CZYLHARTZ et FURTH [24] trouvent des différences fondamentales entre le comportement de ces catalyseurs dont l'activité se traduit par des courbes différentes. BATELLI et STERN [14] fixent la température optimum à 55° pour l'hémoglobine et à 37° pour la peroxydase. A. BACH et S. ZUBKOWA [9] mettent au point un microdosage de l'activité peroxydasique du sang. Ils trouvent que l'hémoglobine est thermostable alors que l'action peroxydasique d'une solution de sang très dilué est thermolabile ; ils attribuent l'activité de celle-ci à la présence d'une peroxydase dans le sang. WOLFF et STOECKLIN [105] montrent que l'hémoglobine dans la réaction de l'oxydation de l'acide iodhydrique par l'eau oxygénée fonctionne comme une véritable et très active peroxydase. WILLSTÄTTER et POLLINGER [102] confirment leur conception mais réussissent à préparer des peroxydases végétales très actives et établissent, par leur méthode de dosage au pyrogallol, que la différence fondamentale séparant l'hémoglobine d'une peroxydase végétale est la faiblesse de son action enzymatique qui est 10.000 à 30.000 fois inférieure à celle des peroxydases végétales. Ces résultats creusent un fossé profond entre hémoglobine et peroxydases, rayant pratiquement le pigment sanguin du groupe des catalyseurs biologiques.

Il existe autant d'idées contradictoires sur l'action peroxydasique de l'hémoglobine que de travaux ayant trait à cette question.

L'étude qui va suivre a pour but de comparer par plusieurs techniques différentes l'action peroxydasique de l'hémoglobine à celle des peroxydases afin de rechercher s'il existe une spécificité de ces catalyseurs vis-à-vis du peroxyde employé comme vis-à-vis du substrat et de rechercher si l'opinion de WILLSTÄTTER [39] doit être considérée comme définitive ou si, au con-

traire, le chromoprotéide du sang peut être rangé dans le groupe des enzymes d'oxydation.

I. — *Préparation de l'oxyhémoglobine cristallisée.*

Nous avons employé la méthode classique modifiée par KEILIN et HARTREE [53]. Le sang frais oxalaté de cheval est centrifugé et les globules séparés sont lavés trois fois avec une solution de ClNa à 9 p. 1.000. 300 cm^3 de globules ainsi obtenus sont refroidis et laqués avec 90 cm^3 d'eau distillée glacée et 90 cm^3 d'éther, lavés avec de la soude normale. Le mélange est vigoureusement agité pendant 5 minutes et centrifugé. A l'aide d'une pipette on prélève la couche inférieure que l'on introduit dans un bécher plongeant dans un mélange réfrigérant, glace-sel marin. On verse goutte à goutte de l'alcool glacé dans la solution jusqu'à une concentration de 20 p. 100. Après deux à trois heures les cristaux formés sont essorés, lavés avec de l'alcool à 20 p. 100 glacé, et repris par le minimum d'eau à 39° en ajoutant 10 cm^3 de soude N/10 pour 100 cm^3 de solution. Après dissolution on neutralise exactement par ClH N/10 ; on centrifuge et on laisse la solution toute la nuit à la glacière. On peut procéder à plusieurs recristallisations. L'oxyhémoglobine cristallisée est conservée au frais.

II. — *Dosage de l'hémoglobine.*

Nous avons mis au point une méthode de dosage du fer basée sur l'oxydation de l'acide iodhydrique par l'ion ferrique selon la réaction



L'iode libéré est titré par l'hyposulfite N/100.

On introduit dans un creuset de porcelaine de 30 cm^3 de capacité 0,5 à 1 g. d'hémoglobine cristallisée ou 1 à 2 cm^3 de sang et 0,2 cm^3 de nitrate de magnésium à 50 p. 100. On évapore à sec et l'on porte le creuset recouvert d'un couvercle dans le four électrique. La température est portée à 600-700° pendant une heure. Après refroidissement le résidu est repris par 10 à 15 gouttes d'acide sulfurique, 2 gouttes d'acide nitrique (ces deux réactifs doivent être exempts de fer et de cuivre) 1 à 2 cm^3 d'eau. On agite jusqu'à dissolution complète et on évapore sur une toile d'amiante. Les résidus sont repris par 0,5 cm^3 de SO_4H_2 5 N, 4 cm^3 d'eau bidistillée, 2 cm^3 d'iodure de potassium à 20 p. 100. L'acide sulfurique, l'eau, et la solution d'iodure ont été privés de gaz par agitation dans le vide. L'iode est libéré rapidement et on le titre au bout d'une minute en présence d'empois d'amidon par l'hyposulfite N/100 dont 1 cm^3 correspond à 0,00056 g. de fer. Un atome de fer (56 g.) correspond à 17.000

g. d'hémoglobine environ. On prépare une solution d'oxyhémoglobine M/1.000.

III. — Action peroxydasique de l'oxyhémoglobine.

1) Le premier caractère classique qui oppose l'hémoglobine aux peroxydases est la thermostabilité relative des solutions diluées du pigment sanguin. Mais beaucoup plus significative nous semble sa fragilité à l'action oxydante des peroxydes. A leur contact, la solution d'oxyhémoglobine devient rouge violacé, brune et enfin verdâtre : la destruction du chromoprotéide est alors totale, le fer est libéré et peut être mis en évidence par addition de quelques gouttes d'acide chlorhydrique et d'une solution de ferrocyanure de potassium.

2) WILLSTÄTTER et POLLINGER [102] ont établi d'autre part : que l'activité peroxydasique de l'hémoglobine augmentait presque proportionnellement avec la concentration du peroxyde alors que celle des peroxydases était rapidement inhibée par des concentrations trop fortes de H_2O_2 (fig. 8 empruntée au travail de WILLSTÄTTER et POLLINGER).

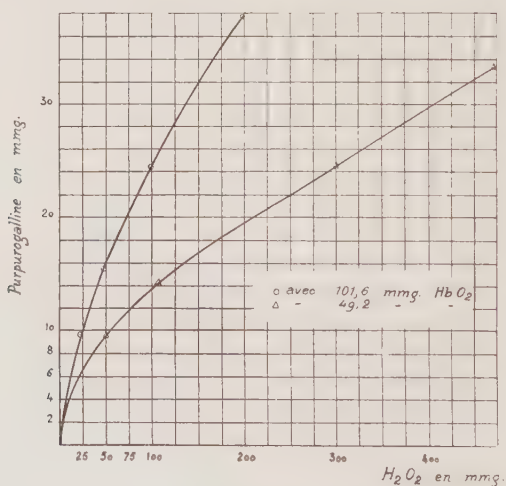


FIGURE 8.

Influence, sur l'activité peroxydasique de l'oxyhémoglobine du Cheval, de la concentration de H_2O_2 .

(D'après R. WILLSTÄTTER et A. POLLINGER).

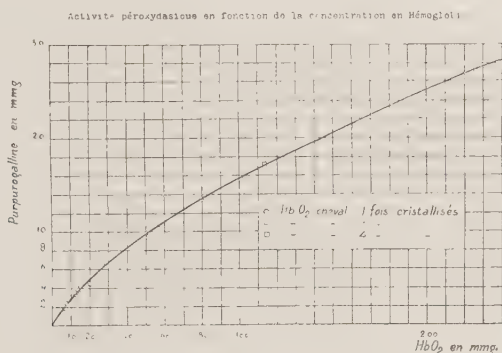
3° Ils ont également montré que la quantité de substrat oxydé était dans le cas des peroxydases rigoureusement proportionnelle à la quantité de catalyseur mise en jeu alors que ceci ne s'applique pas à l'oxyhémoglobine comme on le voit sur la

fig. n° 9 du travail de WILLSTÄTTER et POLLINGER. Les tableaux II et V montrent que U.I. et U.I.a. augmentent proportionnellement quand la quantité d'hémoglobine passe de 0,1 mg. à 1 mg. pour U.I. et de 1,5 mg. à 6 mg. environ quand on mesure le temps d'apparition de la coloration bleue de l'amidon dans la solution en présence de 0,5 cm³ d'acide ascorbique (Tableau II).

TABLEAU II.

Temps d'oxydation de 0,5 cm³ d'acide ascorbique en fonction de la quantité d'hémoglobine.

Hb M/2.000 .	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1 cm ³
Temps.....	∞	6 m. 30 s.	2 m. 10 s.	1 m. 8 s.	47 s.	37 s.	30 s.	24 s.	24 s.	24 s.	23 s.



Activité peroxydasique en fonction de la concentration en Hémoglobine.
(D'après R. WILLSTÄTTER et A. POLLINGER).

4° L'activité de 1 mg. d'oxyhémoglobine exprimée en P.Z. est comprise suivant les espèces entre 0,09 et 0,15 (tableau III). Pour une même espèce l'activité n'est pas constante mais oscille dans les limites étroites. Ce qui ressort de la comparaison des P.Z. et U.I.a. c'est la différence d'activité peroxydasique que l'on trouve en fonction de la méthode employée. Dans le cas particulier de l'hémoglobine de cheval on voit sur le tableau I que le chiffre trouvé avec l'eau oxygénée est presque 10 fois plus grand dans le cas de l'oxydation de l'acide ascorbique que dans celui de l'oxydation du pyrogallol. Il devient 40 à 50 fois plus élevé avec les hydroperoxydes d'alcoyle. Ainsi U.I.a. C₂H₅OOH est 4 fois plus fort que U.I.a. H₂O₂. On observe l'inverse avec les peroxydases. Le coefficient d'activation de la réaction passe de 2,8 avec H₂O₂ à 52 avec C₂H₅OOH. Mais l'oppo-

TABLEAU III.

Activités peroxydasiques de différentes hémoglobines exprimées en PZ en Ula et en UI.

1 mg. H ₂ O ₂	PZ (1) H ₂ O ₂	Ula C ₂ H ₅ OOH	UI C ₂ H ₅ OOH
Homme.....		1,8 à 2	0,75
Singe.....		2	0,75
Cheval.....	0,152	4,7	2,5
Bœuf.....	0,114	4,5	2,5
Veau.....		4,6	2,4
Porc.....	0,093	4,3	2,3
Mouton.....		2,6	1,75
Lapin.....		3	1,14
Cobaye.....		2,94	1,7
Chien.....	0,115	2,4	1
Coq.....		2,55	1,14

sition est encore plus frappante dans le cas de l'hydroperoxyde de méthyle qui donne les chiffres les plus forts avec HbO₂ et les plus faibles avec les peroxydases.

5° U.I. C₂H₅OOH est le tiers de U.I.a. C₂H₅OOH (tableau II) alors qu'avec la peroxydase végétale, ces unités étaient égales. Le tableau IV met en évidence la remarquable activation des hydroperoxydes d'éthyle et de méthyle par l'hémoglobine comparativement à celle du peroxyde d'hydrogène. Il y a un renversement des activations observées au cours de l'étude des peroxydases et, à la spécificité relative de ces enzymes à l'égard du peroxyde d'hydrogène, se substitue ici celle de l'hémoglobine vis-à-vis des hydroperoxydes d'alcoyle qui sont environ 20 fois plus activés que l'eau oxygénée. En employant pour chaque système une méthode de dosage appropriée, la différence de l'activité de ces catalyseurs biologiques n'est plus de 10.000 à 30.000 mais de 100 à 300 seulement. La peroxydase la plus active du règne végétal conserve bien toujours la première place mais si on rapporte à un gramme de tissu les unités précédentes, le sang devient 1.500 fois plus actif que le raifort qui est la plante la plus riche en peroxydase (tableau IV.).

(1) R. WILLSTÄTTER et A. POLLINGER.

TABLEAU IV.

Activités comparées d'une peroxydase active de l'hémoglobine et de la Méthémoglobine.

1 mg. d'enzyme	P.Z. H ₂ O ₂	UI (23°) H ₂ O ₂	UIa (37°) H ₂ O ₂	UIa (37°) CH ₃ OOH
Peroxydase du raifort	1.000	780	1.170	96
HbO ₂ (cheval).....	0,152	1,02	2	12
Methb.....	0.2	3,2	6,4	19,2
Péroxydase raifort HbO ₂ cheval	8.700	765	585	8

$$\frac{\text{Peroxydase UIa H}_2\text{O}_2}{\text{Hb UIa CH}_3\text{OOH}} = \frac{1170}{12} < 100$$

$$1 \text{ g. de raifort UIaH}_2\text{O}_2 = 0,8$$

$$1 \text{ g. de sang U.IaC}_2\text{H}_5\text{OOH (37°)} = 1.800$$

6° Le sixième caractère différentiel qui oppose peroxydase et hémoglobine a trait à la cinétique de la réaction catalytique. L'activité de la peroxydase s'inscrit selon une droite alors que la réaction catalysée par Hb, brutale et rapide au début, diminue rapidement pour s'annuler au cours de la 3^e ou de la 4^e minute quand on ne titre pas l'iode progressivement. C'est la raison pour laquelle le dosage classique de l'activité peroxydasique de l'hémoglobine, par la méthode iodométrique, s'effectue, en titrant par l'hyposulfite, l'iode au fur et à mesure de sa libération, ce métalloïde, inhibant comme on sait, ce catalyseur (Tableau V).

Le tableau V montre que les chiffres ainsi obtenus sont toujours supérieurs à ceux que l'on trouve quand on titre au bout de 5 minutes. Mais ce dosage est imprécis car il modifie, d'une façon irrégulière et continue, les conditions expérimentales et les chiffres trouvés au cours de plusieurs essais sont rarement les mêmes. En réalité il ne s'agit pas d'une destruction du catalyseur par l'iode naissant mais de son inhibition par l'augmentation du potentiel d'oxydoréduction du milieu. A un certain équilibre $\text{I}_2 \rightleftharpoons 2 \text{IH}$ la catalyse est inhibée et le catalyseur est protégé contre l'action oxydante du peroxyde. L'activité reprend dès que l'équilibre est détruit par addition d'un réducteur et la solution réduite conserve longtemps la coloration rose-violacée témoin de la conservation de l'hémoglobine. Plus significative encore est l'expérience suivante mentionnée sur le tableau V : si, avant l'addition du peroxyde, on ajoute à 10 cm³ de la solu-

tion citratée à pH 5,8 contenant 1,7 mg. de Hb, des quantités croissantes d'iode N/100, on constate que, si l'équilibre final est réalisé au début de la réaction, on retrouve au bout de 5 minutes approximativement l'iode ajouté. Il s'agit donc d'un « pseudo équilibre » car l'on ne saurait concevoir que la réaction d'oxydation de IH soit une réaction réversible. En conclusion, l'activité peroxydasique de l'hémoglobine est liée au potentiel d'oxydoréduction du milieu, alors qu'elle en était indépendante dans le cas des peroxydases.

TABLEAU V.

Inhibition de HbO_2 par l'iode.

Hb M/1000	I N/100 litre au bout de 5 min.	I libéré en titrant progressivement pendant 5 min.	Péroxyde N/10 utilisé (en cm ³)	I N/100 ajouté au début de la réaction (en cm ³)
0,01	0,3	0,6	1	0
0,02	0,9	1,5	»	»
0,03	1,6	2,4	»	»
0,04	2,4	3,2	»	»
0,05	3,1	4	»	»
0,06	3,55	4,25	»	»
0,07	3,9	4,8	»	»
0,08	4,1	5,2	»	»
0,09	4,3	5,5	»	»
0,1	4,5	5,85	»	»
0,5	5,4	8,8	3,5	0
1	5,9	11,7	»	»
0,1	4,6	»	1	1
0,1	4,8	»	»	2
0,1	4,9	»	»	3
0,1	4,9	»	»	4
0,1	5,5	»	»	5
0,1	6,1	»	»	6

7° Contrairement à ce que nous avons observé au cours de l'étude des peroxydases, les réducteurs biologiques (acide ascorbique, glutathion, cystéine) influent considérablement sur l'activité de l'hémoglobine.

a) La figure 10 montre que, à pH 3,7, la vitesse de la réaction est d'autant plus augmentée que le pouvoir réducteur de l'accepteur de l'iode est plus grand. Mais ceci n'est vrai qu'au début de la réaction car l'hémoglobine est rapidement détruite dans un pareil système. On observe le coefficient d'activation le plus élevé avec le glutathion, vient ensuite la cystéine et en dernier lieu l'acide ascorbique.

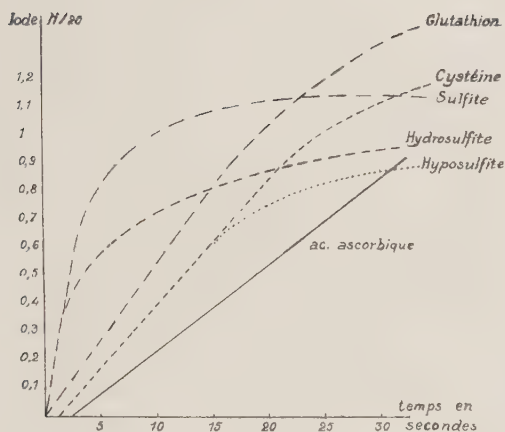


FIGURE 10.

Influence des réducteurs sur le système $C_2H_5OOH-HbO_2-IH$.

b) en présence de réducteurs minéraux forts, la vitesse est considérablement augmentée et l'allure générale de la courbe est la même que dans le cas de la peroxydase (fig. 6). Ceci est en accord avec le fait que la fraction active des peroxydases végétales, comme celle du pigment sanguin, est bien une porphyrine ferrugineuse.

c) la figure 13 montre que le pH optimum de la réaction $ROOH-IH$ qui est compris entre 5,5 et 6 en l'absence de réducteur, est porté à 3,7 en présence d'un réducteur et quel que soit celui-ci. Le pH optimum devient le même que celui des peroxydases végétales.

Il dépend également du sel tampon utilisé : (fig. 17).

8° Mais la spécificité des enzymes peroxydasiques vise également le substrat :

a) PHÉNOLS. — Comme le pyrogallol et le gaïacol, ils sont très rapidement oxydés par le peroxyde d'hydrogène en présence de peroxydase. Ils ne sont que faiblement oxydés par le système $ROOH-Hb$: c'est une des raisons pour laquelle la méthode de WILLSTÄTTER et STOLL qui convient parfaitement au dosage de l'activité des hydroperoxydases ne peut être appliquée à celui de l'hémoglobine.

b) ACIDE ASCORBIQUE, CYSTÉINE ET GLUTATHION. — Nous avons confirmé que le substrat n'était pas oxydé par les peroxydases purifiées. M. FISCHER [36] a montré que l'acide ascorbique à pH 7 est oxydé notablement par H_2O_2 en présence de HbO_2 . Mais nous avons établi par la technique décrite au chapitre des peroxydases (p. 13) que l'hémoglobine catalyse l'oxydation de l'acide ascorbique et que celle-ci est aussi rapide en présence comme en l'absence d'acide iodhydrique.

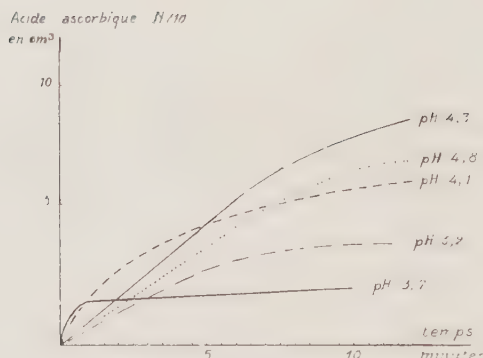


FIGURE 11.

Influence du pH sur le système $C_2H_5OOH-HbO_2$ -acide ascorbique (IH).

La fig. 11 montre que le pH optimum de cette réaction est situé à 4,3 et met en évidence que ce système peroxydasique, dans lequel l'iode ne sert que d'indicateur de la fin de la réaction, évolue comme un système d'une peroxydase végétale. La transformation de l'acide ascorbique en acide déhydroascorbique s'inscrit selon une droite au début de la réaction et se poursuit pendant un temps très long. L'acide ascorbique a dans ce système un double rôle : il est le substrat oxydable et il potentialise l'action peroxydasique de l'hémoglobine. L'évolution d'un tel système présente toutes les caractéristiques d'une réaction peroxydasique par la régularité et la continuité de sa cinétique, par sa thermolabilité et enfin par sa spécificité relative qui s'oppose dans le schéma suivant à celle des peroxydases végétales :

- (1) H_2O_2 — peroxydase — IH — acide ascorbique (2)
- (2) $ROOH$ — Hb — acide ascorbique (IH)

A pH 3,7 le réducteur sert d'accepteur de l'iode libéré et modifie la vitesse de la catalyse de l'hémoglobine. A pH 4,3 — 4,5 l'acide ascorbique devient le substrat oxydable. Entre pH 5 et 7 avec un optimum situé à 6 la cystéine est oxydée en cystine. Entre 6,5 et 7,5 le glutathion réduct est transformé en glutathion oxydé. Cependant comme l'indique le tableau VI et la fig. 12 la vitesse d'oxydation de la cystéine est 8 fois plus petite que celle de l'acide ascorbique. U.I.a. est de 4,7 ; U.I.c. de 0,59. Cette vitesse devient très faible avec le glutathion : U.I.g. = 0,023, mais l'oxydation de ce dernier a lieu dans la zone du pH du plasma sanguin. Il est intéressant d'étudier comparativement l'action de ces réducteurs sur la méthémoglobine formée par action du ferriocyanure de potassium. On suit par la méthode suivante la réduction de la méthémoglobine par les substances biologiques précitées.

On introduit dans les tubes de 8 à 10 mm. de diamètre 1 cm³

de Methb M/1000, 1 cm³ d'eau, 1 cm³ de solution de citrate M/20 à pH déterminé et 0,1 cm³ du réducteur N/100 dosé par rapport à une solution titrée d'iode. On incline le tube sur un fond blanc fortement éclairé afin de suivre le virage de la solution du brun au rouge par transformation de la methb. en HbO₂ et on mesure le temps de réduction en fonction du pH. On constate que la zone de pH optimum de cette réduction est située entre 4, et 5,5 pour l'acide ascorbique entre 5,5 et 6,5 pour la cystéine et entre 6,5 et 7,5 pour le glutathion. Les temps de réduction sont très approximativement, au pH optimum, de 15 secondes pour l'acide ascorbique, de 60 secondes pour la cystéine et de 15 minutes pour le glutathion (fig. 12). Le tableau VI compare les U.I. obtenus par le calcul avec la methb et les U.I. correspondant aux systèmes peroxydasiques étudiés précédemment. La fig. 12 objective ces résultats en montrant que dans les deux cas le pH optimum de l'oxydation est situé au même niveau et que la différence porte sur la vitesse de la réaction qui est beaucoup plus grande avec le dérivé HbO₂-ROOH.

Tout se passe comme si ce dernier était un dérivé d'oxydation instable du pigment sanguin présentant les mêmes modalités d'action vis-à-vis d'un substrat oxydable que la méthémoglobine.

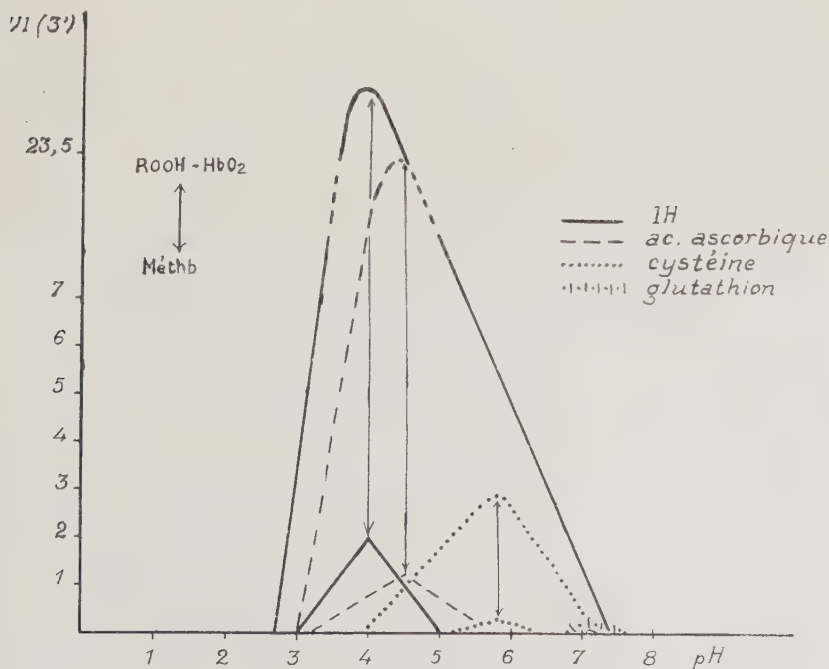


FIGURE 12.

Activité et pH optimum des systèmes
 ROOH—HbO₂—substrat oxydable
 Méthb—substrat oxydable.

TABLEAU VI.

Oxydation comparée de l'acide ascorbique de la cystéine et du glutathion par la méthémoglobine et par le dérivé HbO_2-ROOH .

Réducteur	Temps approximatif de la réduction		UI (1 mg.) méthémo- globine	UI (1 mg.) $HbO_2 + ROOH$
	1 cm ³ méthé- moglobine M/1000	1 cm ³ dérivé $HbO_2 + ROOH$ M/1000		
1 cm ³ ac. ascor. N/100 pH 4,4 — 5	15 sec.	0 min. 03 sec.	0,07	4,7
1 cm ³ cystéine N/100 pH. 5,8	60 sec.	2 sec.	0,017	0,59
1 cm ³ glutathion N/100 pH. 7,2	15 m.	45 sec.	0,0012	0,023

c) ACIDE IODHYDRIQUE. — Son oxydation est activée par l'hémoglobine comme par les peroxydases et d'une façon générale par toutes substances présentant une action peroxydasique. On peut dire qu'un catalyseur de peroxydation est une substance capable d'activer la réaction peroxyde-acide iodhydrique.

10° *Action de la température.* — La fig. 7 montre qu'il existe dans les réactions catalysées par l'hémoglobine un optimum très précis de température situé entre 37 et 40°. A 38° l'activité catalytique de l'hémoglobine est deux fois plus grandes qu'à 23° alors que celle de la peroxydase n'a augmenté que de 50 p. 100. Au dessus de 40° la vitesse de la réaction diminue très rapidement avec l'hémoglobine et s'annule au dessus de 50°. On peut cependant atteindre 80 à 90° sans détruire complètement le catalyseur, car après refroidissement, la solution d'hémoglobine donne encore des réactions positives avec les réactifs de WEBER et de MEYER. Mais il s'agit là d'une action catalytique en rapport avec l'hématine non détruite par opposition à l'action enzymatique qui n'est pas régénérée par refroidissement car U.I.a. après chauffage a perdu 80 à 90 p. 100 de sa valeur initiale.

11° *Action du pH.* — Le pH optimum, comme l'indique la figure 12, est fixé non pas par l'hémoglobine, mais par le substrat oxydé. La vitesse d'oxydation est d'autant plus grande qu'il est plus rapproché de 3,7. Il est beaucoup plus précis avec l'acide ascorbique, la cystéine, le glutathion qu'avec l'acide iodhydrique où il est compris entre 5,4 et 6 et la benzidine qui est oxydée rapidement à pH 5 comme à pH 7. Pour IH, il est situé à 5,5-6 mais en présence de réducteurs, il est toujours en milieu citraté

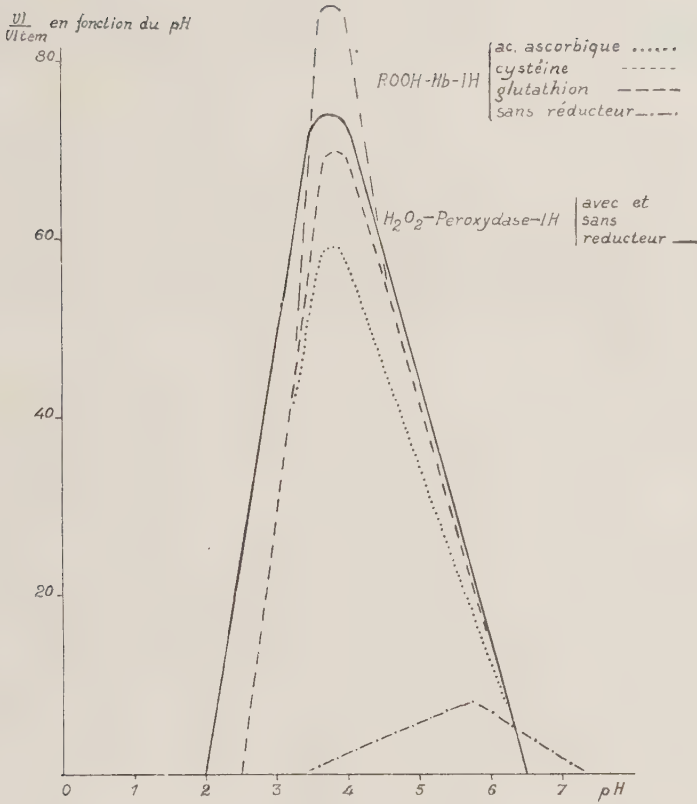


FIGURE 13.

pt. optimum et coefficient d'activation $\frac{U.I.}{U.I. \text{ tem}}$ des systèmes peroxydasiques avec ou sans réducteur.

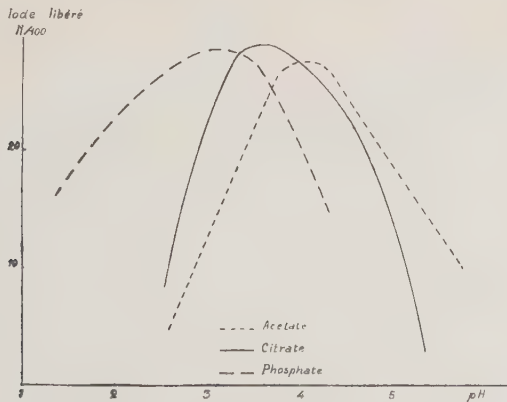


FIGURE 14.

Influence de la solution tamponnée sur le pH optimum du système $ROOH-HbO_2-IH (S_2O_8Na_2)$.

à pH 3,7-3,9 (fig. 13) — à pH 3,5-3,7 en milieu phosphaté et à pH 3,9-4,2 en milieu acétate — (fig. 14).

ACTION PEROXYDASIQUE DES DÉRIVÉS DE L'HÉMOGLOBINE.

1° *La méthémoglobine.* — Les tableaux VII et VIII montrent que l'action catalytique de la méthb. est presque le double de celle de l'hémoglobine. U.I.a. = 8 au lieu de 4,7. La spécificité de la méthb. vis-à-vis des hydroperoxydases d'alcoyle est moins marquée que celle de l'hémoglobine. U.I.a. H_2O_2 étant presque la moitié de U.I.a. $\text{C}_2\text{H}_5\text{OOH}$.

TABLEAU VII.

Activités peroxydasiques des dérivés de l'hémoglobine.

1 mg.	U-I-a $\text{C}_2\text{H}_5\text{OOH}$	U-I a. $\text{H}_2 \text{ O}_2$	U-I $\text{C}_2\text{H}_5\text{OOH}$
HbO ₂ cheval	4,7	1,02	2,6
Methb	8	3,2	2,9
COHb	1,7	0,7	3
HCNHb	3	0,94	2,6
H ₂ SHb	0	0	0

2° *Sulphémoglobine.* — L'action de SH_2 sur HbO₂ lui enlève toute propriété enzymatique : U.I.a = U.I.d. = 0.

3° *Carboxyhémoglobine.* — U.I.a. passe de 4,7 (HbO₂) à 1,7. Le tableau IX montre que le retard porte essentiellement sur le début de la réaction. L'apparition de la coloration bleue est retardée au début (tableau VIII) mais, dès que la réaction est amorcée, elle évolue de plus en plus rapidement et l'on peut admettre que l'oxyde de carbone, par empêchement stérique, protège le fer contre l'action oxydante du peroxyde. Mais l'inhibition est plus marquée avec l'acide ascorbique car U.I. est supérieur à U.I.a.

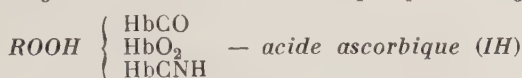
4° *Cyanhémoglobine.* — U.I.a. = 3. La diminution de la vitesse de la réaction est moins importante que dans le cas précédent. Le mécanisme d'inhibition de la catalyse est le même que dans le cas précédent, il porte essentiellement sur le début de la réaction (tableaux VIII et IX).

Il est intéressant de constater que les mêmes agents inhibent l'action des oxydases et des peroxydases. Il y a blocage du fer

par CO ou CNH et l'inhibition est d'autant plus importante que l'agent inhibiteur lui est plus fortement lié.

TABLEAU VIII.

Temps d'oxydation de l'acide ascorbique par les systèmes :



A. — Peroxyde = H_2O_2

Acide ascorbique N/10.....	0,15	0,3	0,5	0,9	1,2
Temps d'oxydation par :					
1 cm ³ HbO ₂ m/1000 (17 mg.).	—	14 s.	29 s.	—	1 m. 40 s.
1 cm ³ COHb m/1000.....	37 s.	63 s.	—	2 m. 15 s.	3 m. 7 s.
1 cm ³ HCNHb m/1000.....	—	34 s.	—	—	2 m. 24 s.

Acide ascorbique N/10.....	1,5	1,7	1,9	2,1	—
Temps d'oxydation par :					
1 cm ³ HbO ₂ m/1000 (17 mg.).	—	—	2 m. 34 s.	3 m. 45 s.	—
1 cm ³ COHb m/1000.....	—	—	—	—	—
1 cm ³ HCNHb m/1000.....	2 m. 45 s.	3 m. 40 s.	—	—	—

B-Peroxyde = $\text{C}_2\text{H}_5\text{OOH}$

Acide ascorbique N/10 ..	0,5 cm ³	1 cm ³	1,5 cm ³	2 cm ³
5,1 mg. HbO ₂	33 s.	1 m. 10 s.	1 m. 30 s.	2 m. 30 s.
8,5 mg. HCNHb.....	1 m. 15 s.	2 m. 15 s.	2 m. 58 s.	3 m. 50 s.
2,55 mg. Methb.....	35 s.	1 m. 25 s.	1 m. 58 s.	3 m. 10 s.
17 mg. COHb.....	1 m. 10 s.	1 m. 40 s.	2 m. 05 s.	2 m. 30 s.

TABLEAU IX.

Dosage progressif par l'hyposulfite N/100 de l'iode libéré à pH 5,8 par le système ROOH-Hb-IH. (HbO₂ = 1 mg., 7).

Dosage au bout de 5 minutes.

Temps minutes	I N/100 libéré			I N/100 libéré		
	HbO ₂	HCNHb	COHb	HbO ₂	HCNHb	COHb
1	2,8	1,1	0,6	4,4	4,4	5,2
2	4,1	3,5	3			
3	5,1	4,5	4,1			
4	6,2	5,6	5			
5	7,2	6,6	5,8			

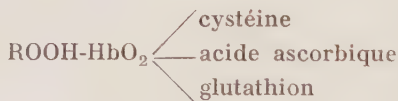
L'oxyhémoglobine, par son état cristallisé et sa constitution bien définie, se prête remarquablement à l'étude du mécanisme de l'action peroxydasique. Elle acquiert un fonctionnement catalytique vraiment comparable à celui d'une peroxydase, quand son système peroxydasique est complété par une substance réductrice, dont le rôle est de permettre l'utilisation du dérivé instable d'oxydation responsable de la catalyse dans une zone de pH où il est particulièrement actif. Cette substance activatrice peut être le substrat lui-même et c'est ainsi que l'acide ascorbique à pH 4,4 non seulement potentialise l'action peroxydasique de Hb mais encore la protège très longtemps contre l'action oxydante du peroxyde. On peut, par analogie, considérer que la fraction active d'une peroxydase est formée par l'association d'une porphyrine ferrugineuse à fer trivalent en liaison avec une substance réductrice qui confère au complexe son activité enzymatique et son indépendance vis-à-vis du peroxyde et du pouvoir réducteur du milieu. Mais dans le cas où un réducteur minéral fort est employé, il y a transformation du fer trivalent en fer bivalent et la fraction active devenue « protohème-sulfite » présente la même cinétique que l'association « Hb-sulfite ». On peut représenter la constitution d'une peroxydase par le schéma suivant :

protéine-porphyrine — Fe = Substance réductrice.

Ce catalyseur présente une spécificité relative vis-à-vis du peroxyde et du substrat qui fait toute la valeur du système peroxydasique biologique de SZENT-GYÖRGYI :

H_2O_2 — Peroxydase — flavone — acide ascorbique..

On peut également concevoir que l'hémoglobine répond au système

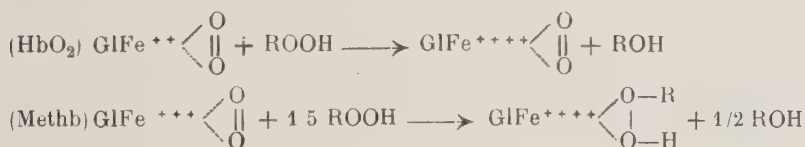


Le substrat jouant ici le rôle d'activateur peroxydasique.

CHAPITRE II.

Etude spectrographique, colorimétrique et manométrique de l'action des peroxydes sur l'oxyhémoglobine. - Existence d'un dérivé d'oxydation supérieure du pigment sanguin.

Par action des peroxydes sur l'oxyhémoglobine et sur la méthémoglobine, on obtient un dérivé de coloration rouge-violacée, qui a conservé ou recouvré les valences de coordination du fer et peut donner des composés d'addition. Spectrographiquement, il s'individualise par l'association des bandes de l'oxyhémoglobine et de la bande de la méthémoglobine, située dans le vert à 500 mμ et qui est caractéristique de l'oxydation du fer — tandis qu'on n'observe ni la bande dans le rouge (630 mμ) ni la transparence dans le jaune, qui sont spécifiques de la méthémoglobine et en rapport avec la perte des valences de coordination du fer. Les peroxydes ne sont donc pas des agents méthémoglobinisants et l'action peroxydasique de l'oxyhémoglobine est due à la formation d'un dérivé d'oxydation supérieure très instable. L'activité catalytique de ce dernier ne diffère de celle de la méthémoglobine que par son ordre de grandeur plus élevé. Il est obtenu par les réactions :



C'est en 1900 que KOBERT [55] observe pour la première fois qu'une solution de méthémoglobine vire du brun au rouge violacé quand on lui ajoute de l'eau oxygénée et que le composé

ainsi formé présente trois bandes diffuses d'absorption, situées respectivement vers 600-584 $m\mu$, 558-545 $m\mu$, et 513-500 $m\mu$. KOBERT le considère comme un composé d'addition Méthb- H_2O_2 . Il est très instable et redonne rapidement la Methb. HAUROWITZ [45], en 1924, confirme cette observation, mais pense qu'il s'agit d'une transformation de la Methb. acide en Méthb. alcaline sous l'influence de l'eau oxygénée, le spectre de la Méthb. alcaline étant, selon cet auteur, très voisin de celui du composé obtenu. La question a été reprise par HAUROWITZ et par KEILIN et HARTREE (1935) [53] qui en font l'objet d'une étude spectrographique et manométrique très précise. KEILIN et HARTREE font agir sur une solution de méthémoglobine électrodialysée, soit de l'eau oxygénée, soit de l'hydroperoxyde d'éthyle. Dans les 2 cas, les bandes spectrales de la Méthb. sont remplacées par deux bandes diffuses : la première à 589 $m\mu$, non symétrique, présente un maximum d'absorption du côté des grandes longueurs d'onde ; la deuxième est symétrique et son centre est à 545 $m\mu$. La troisième bande décrite par KOBERT (513-500 $m\mu$) appartiendrait à la Méthb. libre. L'étude quantitative les conduit aux conclusions suivantes :

1° le composé rouge violacé s'obtient par action d'une molécule de peroxyde sur une molécule de Méthb et répond à la formule Méthb- H_2O_2 (Tableau X).

2° Il est très instable et se transforme rapidement et irréversiblement en Méthb.

3° La catalase est sans action sur lui et ne détruit que l'excès d'eau oxygénée qui n'a pas réagi sur la Méthb.

TABLEAU X.

Dosage manométrique de l'excès d' H_2O_2 qui n'a pas réagi sur la Méthb. après décomposition par la Catalase, d'après D. KEILIN et E. F. HARTREE [53].

Méthb cm ³ par at. g. de Fe		Solution tampon	H ₂ O ₂ cm ³ M		Catalase cm ³	O ₂ total p. 100 libéré
2,0	$4,7 \times 10^{-3}$	1,10	0,20	$5,3 \times 10^{-2}$	—	10
2,8	$2,5 \times 10^{-3}$	0,02	0,28	$2,5 \times 10^{-2}$	0,2	0
2,0	$7,0 \times 10^{-3}$	0,80	0,20	$7,0 \times 10^{-2}$	0,3	20
—	— —	3,00	0,20	$4,0 \times 10^{-2}$	0,1	89
—	— —	2,80	0,20	$3,6 \times 10^{-2}$	0,3	111
	— —	2,82	0,28	$5,0 \times 10^{-2}$	0,2	95

TABLEAU XI.

Détermination spectrographique quantitative du dérivé Méthb-H₂O₂ formé d'après D. KEILIN et E. F. HARTREE [53].

N°	Méthb par at. g. de Fe	H ₂ O ₂ M	Pourcentage de Méthb libre	Pourcentage d'H ₂ O ₂ -Méthb	H ₂ O ₂ /Fe
1	5×10^{-4}	0	100	0	0,00
2	5×10^{-4}	$1,7 \times 10^{-4}$	70	30	0,33
3	5×10^{-4}	$3,4 \times 10^{-4}$	40	60	0,67
4	5×10^{-4}	$5,0 \times 10^{-4}$	16	84	1,00
5	5×10^{-4}	$6,7 \times 10^{-4}$	6	94	1,33
6	5×10^{-4}	$8,3 \times 10^{-4}$	2	98	1,67

Ainsi, la méthémoglobine donnerait, avec les peroxydes, des composés d'addition du même type que ceux que l'on obtient avec CNK, NO, FNa, SH₂. Sans en apporter de preuves expérimentales, KEILIN et HARTREE généralisent leur conception à l'hémoglobine : celle-ci serait transformée d'abord en Méthb, qui fixerait ensuite une molécule de peroxyde pour donner le composé d'addition. Si KEILIN et HARTREE ont démontré manométriquement que ce dernier était obtenu par action d'une molécule de peroxyde sur une molécule de méthémoglobine et qu'il donnait un spectre caractéristique, leur interprétation cadre cependant mal avec certaines propriétés de ce dérivé : son irréversibilité, son instabilité très grande, sa réduction instantanée en hémoglobine par des réducteurs forts, et avec la nécessité de faire réagir, par atome de fer, plus d'une molécule et demie de peroxyde (1,67 mol. pour 98 p. 100 de composé) (Tableau XI) (Fig. 19) ; il semble difficile de mettre sur le compte de l'instabilité du produit formé, l'excès de peroxyde nécessaire pour obtenir la transformation totale de la Méthb. Cette interprétation n'est pas non plus en accord avec le travail d'HAUROWITZ, qui a établi que les peroxydes n'étaient pas des agents méthémoglobinisants. Enfin le tableau XII, emprunté au travail de MAGAT, montre qu'il est possible d'injecter à l'homme et aux animaux, de très grandes quantités de peroxyde d'urée sans déterminer de troubles respiratoires. Toutes ces contradictions nous ont amenés à reprendre l'étude de l'action des peroxydes sur l'oxyhémoglobine et la méthémoglobine.

TABLEAU XII.

Doses limites de lécithine-perhydrite supportées par les animaux
(ABRAGAM et MAGAT).

Espèce	Poids moyen	Dose limite
Souris.....	20 g.	0,02 — 0,03 g.
Rat	200 g.	0,3 g.
Poule	1000 g.	1,3 — 1,5 g.
Lapin	1500 g.	0,5 g. (!)
Homme	60 kg.	90 g.

I. — Etude spectrographique et manométrique de la formation de la méthémoglobine acide.

L'oxyhémoglobine cristallisée a été préparée par la méthode classique, modifiée par KEILIN et HARTREE, et décrite précédemment. Le fer a été dosé par la méthode qui y est indiquée (p. 21).

Les photographies des spectres ont été obtenues avec l'appareil ZEISS, une lampe ponctuelle Philips constituant la source lumineuse. Un prisme de HÜFNER superpose les deux faisceaux fournis par deux tubes juxtaposés renfermant, l'un la solution à étudier, l'autre le solvant, en l'espèce l'eau distillée. Sur les courbes, on a porté en abscisses les longueurs d'onde et en ordonnées $\log \varepsilon$, ε étant le coefficient d'absorption défini par la relation $I = I_0 10^{-\varepsilon cd}$ (c concentration moléculaire, d épaisseur de liquide traversé par le rayon d'intensité I_0). Pour une longueur d'onde donnée, l'égalité d'opacité des spectres du solvant et de la solution, mesurée au microscope, correspond à un rapport $\frac{I}{I_0}$ égal à $\frac{2}{\alpha} \frac{\pi}{\alpha}$, α étant l'angle d'ouverture d'un secteur tournant placé sur le faisceau lumineux incident qui traverse le solvant.

Les spectres ont été étudiés sur des solutions d'oxyhémoglobine et de Méthb M/1.000 ; à 2 cm³ de la solution, on ajoutait la quantité voulue de réactif, 1 cm³ de citrate N/20 tamponné à pH 5,2, et l'on complétait à 5 cm³ par de l'eau distillée. On a toujours opéré avec des cuves de 5 et 2,5 mm. d'épaisseur, qui seules convenaient à la région spectrale intéressante.

Nous présentons nos remerciements à Mme RAMART qui, par l'hospitalité qu'elle nous a accordée en son laboratoire, nous a permis de réaliser ce travail.

L'examen des plaques donne lieu aux considérations suivantes :

1° *Spectre de l'oxyhémoglobine* (fig. 15).

Les deux bandes principales sont situées respectivement à 577 $m\mu$ et à 540 $m\mu$ (dans le jaune et le jaune vert). Les deux bandes fusionnent quand on réduit HbO_2 en Hb .

2° *Spectre de la méthémoglobine* (fig. 15).

On prépare la Méthb en faisant agir sur une solution M/1.000 d'oxyhémoglobine un léger excès de solution M/100 de ferricyanure (12 cm^3 pour 100 cm^3 de HbO_2 M/1.000). On soumet la solution à l'action du vide pendant deux heures.

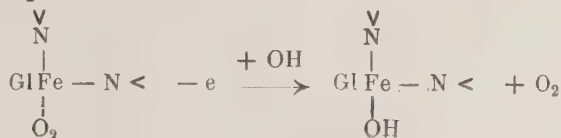
Le spectre de la Méthb présente deux bandes d'absorption situées respectivement dans le rouge à 630 $m\mu$ et dans le vert à 500 $m\mu$. *L'absorption dans le rouge et la transparence dans le jaune entre 610 $m\mu$ et 550 $m\mu$ sont vraiment caractéristiques de la méthémoglobinisation* en milieu acide, et nous considérons que la présence d'une troisième bande dans le jaune est l'indice d'un mélange avec un complexe coordinatif : Hb O_2 par exemple.

En effet, la fig. 16, qui correspond à des mélanges d'oxyhémoglobine et de méthémoglobine, met en évidence que la bande caractéristique de la Méthb est située à 557 $m\mu$, et que la présence dans la solution de HbO_2 se traduit par l'apparition dans le jaune d'une bande d'absorption et par une diminution de la bande située dans le rouge, bande qui est vraiment spécifique de la méthémoglobine, bien que moins sensible que la bande située dans le vert, qui apparaît la première. Son intensité est proportionnelle à la méthémoglobinisation.

En conclusion, l'oxydation du fer divalent de l'hémoglobine en fer trivalent et la perte des valences de coordination se traduisent spectrographiquement par l'apparition d'une bande dans le rouge et d'une transparence totale dans le jaune, la bande située dans le vert n'étant pas caractéristique de ce dérivé, comme nous le verrons plus loin.

3° *Etude manométrique.*

L'action des agents méthémoglobinisants sur l'oxyhémoglobine se traduit par le dégagement de tout l'oxygène fixé, selon la réaction établie par CONANT :



Cette réaction est à la base du dosage manométrique de l'oxyhémoglobine par la méthode de VAN SLYKE et STADIE [97].

II. Etude spectrographique, colorimétrique et manométrique de l'action des peroxydes sur l'oxyhémoglobine et la méthémoglobine.

Action de l'eau oxygénée et des hydroperoxydes d'alcoyle sur HbO₂.

a) Etude spectrographique.

L'action, sur l'oxyhémoglobine, de l'eau oxygénée ou d'un peroxyde organique tel que l'hydroperoxyde d'éthyle entraîne l'apparition dans le spectre d'une troisième bande (fig. 17) dont le maximum est situé à 500 $m\mu$; il y a donc coexistence des deux bandes de l'oxyhémoglobine et de la bande de la Méthb située dans le vert. Cette dernière ne saurait traduire une méthémoglobinisation partielle du chromoprotéide, car la bande caractéristique dans le rouge de ce dérivé n'apparaît absolument pas dans les premières minutes de la formation du composé. Ce spectre tire donc son individualité, non de l'apparition d'une nouvelle bande caractéristique, mais de la présence simultanée des bandes de HbO₂ et de la bande verte de la Méthb que nous considérons comme spécifique de l'oxydation du fer du groupement prosthétique. L'intensité maximum de l'absorption dans le vert est obtenue quand on fait réagir une molécule de peroxyde par atome de fer dans l'hémoglobine. Les peroxydes portent donc le fer de la molécule à un état d'oxydation compatible avec la conservation de ses valences de coordination, comme en témoignent :

- | | | |
|--|---|---|
| a) l'absence d'une bande dans le rouge | } | conservation des valences de coordination du fer. |
| b) l'absorption dans le jaune | | |
| c) la bande dans le vert | | oxydation du fer. |

Nous pensons qu'il est possible d'exprimer la réaction par le schéma suivant :



Ce dérivé d'oxydation est très instable, surtout vers pH 4, et il se transforme spontanément en Méthb :



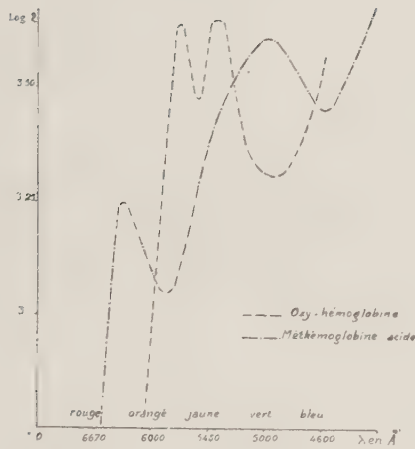


FIGURE 15.

Oxy-hémoglobine et Méthémoglobine acide.

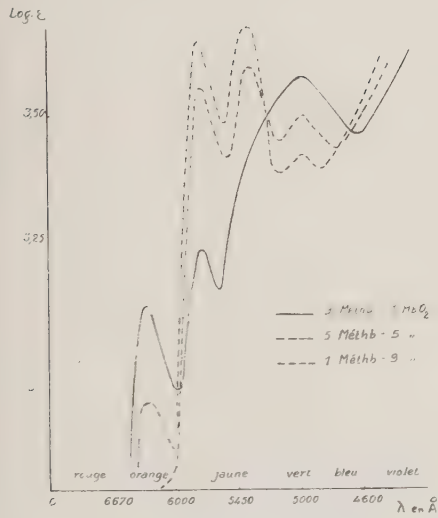


FIGURE 16.

Mélange de méthémoglobine acide et d'oxyhémoglobine.

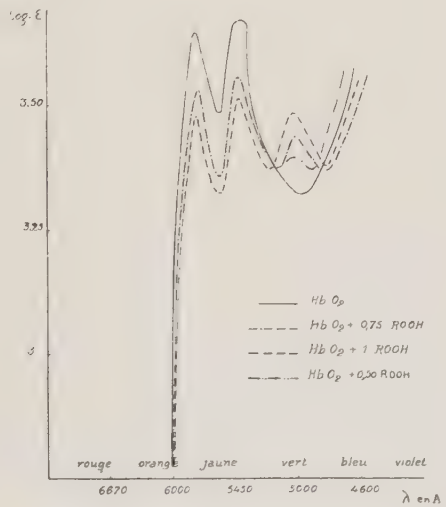


FIGURE 17.

Action de ROOH sur l'oxyhémoglobine.

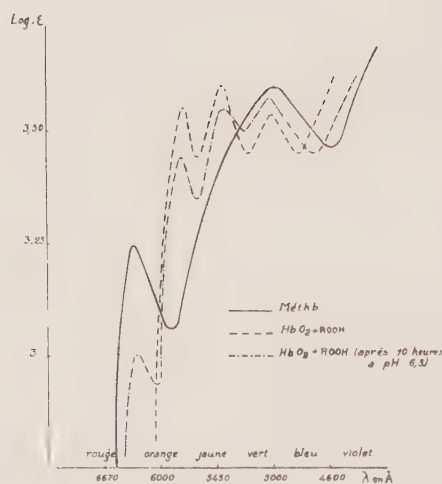


FIGURE 18.

Méthémoglobinisation secondaire de l'oxyhémoglobine par ROOH.

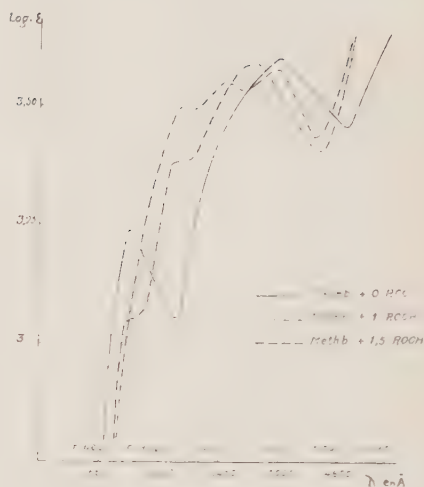


FIGURE 19.

Action de ROOH sur la méthémoglobine.

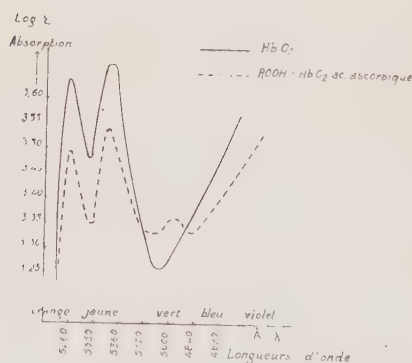


FIGURE 20.

Action de ROOH sur HbO_2 en présence d'acide ascorbique.

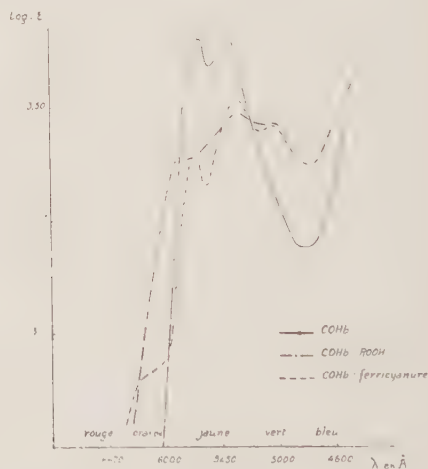


FIGURE 21.

Action comparée du ferricyanure et de ROOH sur la carboxyhémoglobine.

b). Etude manométrique.

Si l'on fait agir du ferricyanure de potassium sur une solution de HbO_2 , le départ d'oxygène se traduit par la formation d'une petite mousse blanchâtre à la surface de la solution, qui vire au brun. Par contre, un excès de peroxyde produit une coloration rouge-violacée, mais ne provoque pas le départ de petites bulles d'oxygène. On peut confirmer ce phénomène par voie manométrique si l'on dose l'oxyhémoglobine par la méthode de VAN SLYKE et STADIE [97] : on constate que toute l'oxyhémoglobine est transformée en Méthb par le ferricyanure, alors qu'une molécule de peroxyde par atome de fer entraîne, à pH 7, le départ d'une quantité insignifiante d'oxygène, quantité qui n'atteint, au bout de 5 minutes, que 10 à 15 p. 100 à pH 5, et 30 p. 100 environ à pH 4,4 (Tableau XIII).

TABLEAU XIII.

Etude manométrique de l'action des peroxydes sur l'oxyhémoglobine.

Quantité de peroxyde par atome de Fer de HbO_2	O ₂ fixé à Hb avant action du peroxyde	O ₂ fixé à Hb après action du peroxyde		
		à pH 4,4	à pH 5,5	à pH 7,2
1/2 mol. de peroxyde	100 0/0	80 0/0	89 0/0	97 0/0
1 mol. de peroxyde {	après 3 minutes.	—	70	78
	» 2 heures ..	—	24	56
2 mol. de peroxyde	—	59	72	88
1 mol. de peroxyde..... (vide = 15 minutes)	—	50	72	86

c) Etude colorimétrique.

On opère dans des tubes de 8 mm. de diamètre, inclinés sur un fond blanc fortement éclairé. Dans chaque tube on introduit :

1 cm³ HbO_2 M/1.000 (cristallisée, exempte de catalase)

1 cm³ citrate M/20 pH 5,2

0,05 à 0,5 de H_2O_2 N/10

H_2O q.s. = { 3 cm³
5 cm³
8 cm³

Les comparaisons colorimétriques sont faites aux 3 dilutions indiquées ci-dessus, par rapport à une solution de Méthb et de

HbO_2 de même dilution à laquelle on a ajouté $0,4 \text{ cm}^3$ de peroxyde N/10.

Le tube 1 contient la solution d'oxyhémoglobine (fig. 22).

Le tube 2 reçoit $1/2$ équivalent d'oxydation et présente une légère coloration rouge. Le tube 3, avec 1 équivalent, a une coloration rouge-violacé plus nette. Celle-ci s'accroît encore dans le tube 4 qui a reçu $1 \frac{1}{2}$ équivalent d'oxydation, pour acquies une intensité à peu près égale dans les tubes 5 et 6 qui ont reçu respectivement 2 équivalents (soit une molécule de peroxyde pour une molécule de HbO_2 : $\text{Fe}/\text{ROOH} = 1$) et 3 équivalents 11. Les tubes 5, 6, 7 présentent la même coloration rouge violacée que les témoins. Cette coloration apparaît rapidement et est complète au bout de 15 à 30 secondes avec l'eau oxygénée.

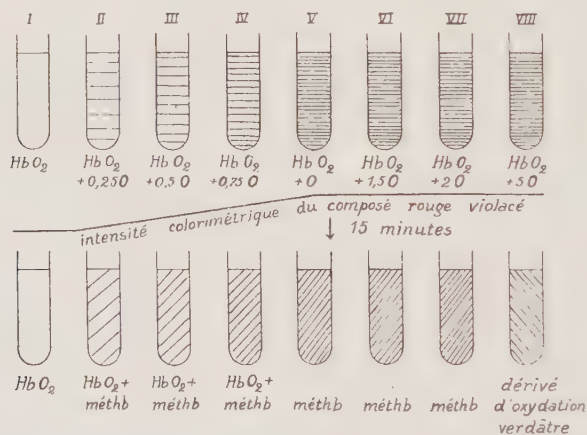
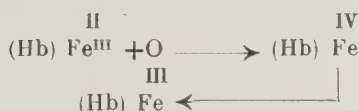


FIGURE 22.

Intensité colorimétrique du dérivé d'oxydation rouge violacé formé par action de H_2O_2 sur HbO_2 .

Elle disparaît progressivement et d'autant plus rapidement que l'on a introduit moins de peroxyde, pour faire place à la teinte de la Méthb, qui est complètement formée au bout de 30 minutes environ à pH 5,2. Mais la méthémoglobinisation n'est totale que dans les tubes 5, 6, 7, les tubes 2, 3, 4 ayant des teintes intermédiaires entre celle de l'oxyhémoglobine et celle de la Méthb. Le tube 8, sous l'influence d'un excès de peroxyde, a viré à une teinte verdâtre qui témoigne de la destruction de l'oxyhémoglobine. Ainsi, la Méthb est formée secondairement à partir du dérivé d'oxydation supérieure, et, contrairement à ce qui a lieu avec les agents méthémoglobinisants, un équivalent d'oxydation n'amène pas la transformation du fer divalent en fer trivalent : A pH 5,2 il faut faire agir 1 mol. de peroxyde par atome

de Fe de HbO_2 pour obtenir une méthémoglobinisation secondaire totale.



Dans une 2^e série d'expériences (fig. 23), chaque tube reçoit, en plus, 0,1 cm³ de ferrocyanure M/100. Dans les tubes 2 et 3, le composé rouge violacé apparaît et fait place immédiatement à la coloration de la méthémoglobine. Dans les tubes 6, 7, 8, la coloration est progressive ; elle est égale dans les tubes 7 et 8. Le ferrocyanure a fait fonction de substrat : il est oxydé en ferricyanure, qui transforme l'oxyhémoglobine en méthémoglobine en redonnant du ferrocyanure. Celui-ci est à nouveau oxydé en ferricyanure par un équivalent de peroxyde ; et c'est alors qu'un excès de ce dernier amène la formation du dérivé rouge-violacé.

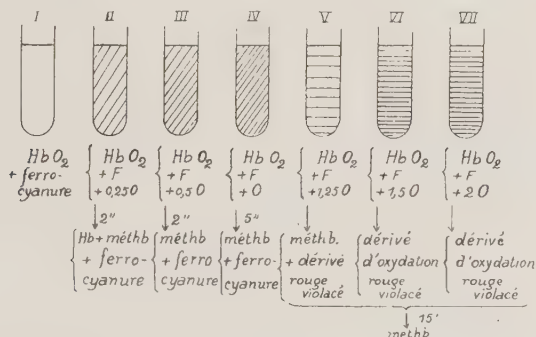


FIGURE 23.

Formation du dérivé rouge violacé par action de H_2O_2 sur HbO_2 en présence de ferrocyanure.

Dans une 3^e série d'expériences, en présence de ferrocyanure, on fait varier le pH entre 3 et 7, pour étudier l'instabilité du composé rouge violacé qui se traduit par une méthémoglobinisation plus ou moins rapide.

Il ressort de cette étude que, pour une température déterminée, la méthémoglobinisation est d'autant plus grande que l'on se rapproche davantage de la zone comprise entre 3,7 et 4. En présence de ferrocyanure, elle est instantanée à pH 4. Elle est d'autant plus lente que l'on se rapproche de la neutralité, pour devenir à peu près nulle au dessus de pH 6. Ainsi, la vitesse d'oxydation du ferrocyanure est fonction de l'instabilité du dérivé rouge-violacé, qui est maximum à pH 3,7, mais la formation de ce dernier précède dans tous les cas la méthémoglobinisation. C'est pourquoi, nous nous sommes placés à pH 5,2 dans les ex-

périences spectrographiques, car au dessous de pH 5 le composé devient trop instable et au dessus de pH 5,5 il se forme d'autant plus lentement que le pH devient moins acide, l'action des peroxydes sur l'oxyhémoglobine étant lente au voisinage de la neutralité.

Ces recherches mettent bien en évidence qu'un dérivé d'oxydation supérieure très instable se forme à partir de l'oxyhémoglobine. Sa transformation en Méthb est d'autant plus rapide que l'on se rapproche d'avantage de pH 3,7 et que l'on opère à une température plus élevée, entre 15 et 40°. A pH 6,5-7, à la température ordinaire, il ne se transforme que lentement, ce qui se traduit spectrographiquement par l'apparition progressive de la bande située dans le rouge, qui s'accroît au fur et à mesure que diminue l'intensité de la bande dans le jaune de l'oxyhémoglobine ; c'est ce que l'on voit sur la figure 18, où l'on a juxtaposé le spectre de la Méthb et ceux du dérivé d'oxydation supérieure photographiés d'une part au bout d'une minute (à pH 5,2) et d'autre part après quelques heures (à pH 6,5).

Action des peroxydes sur la méthémoglobine.

La méthémoglobine préparée par la méthode indiquée ci-dessus est électrodialysée.

α) Etude spectrographique (fig. 19).

L'action d'une molécule de peroxyde sur une molécule de Methb donne les modifications spectrales suivantes :

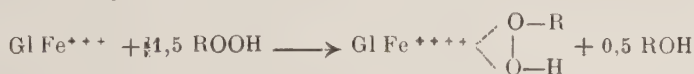
1° La bande située dans le rouge disparaît presque complètement.

2° La bande située dans le vert est déportée vers les grandes longueurs d'onde (maximum à 526 $m\mu$).

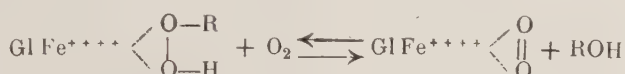
3° Une bande très diffuse apparaît dans le jaune vers 585 $m\mu$. Une molécule de peroxyde est donc venue s'ajouter sur le fer de la Methb. Mais on ne peut concevoir, selon KEILIN et HARTREE, la formation d'un dérivé Methb- HbO_2 analogue aux composés Methb-CN H ou Methb- H_2S , puisque la méthémoglobine a perdu ses valences de coordination. Nous avons d'ailleurs observé qu'une molécule d'acide cyanhydrique réduisait presque instantanément le fer trivalent de la méthémoglobine en fer divalent ; l'action de H_2S doit être du même ordre que celle de CN H . Nous pensons au contraire que, sous l'influence du peroxyde, la Methb est transformée en un dérivé qui a recouvré les valences de coordination du fer.

Dans ce cas, c'est un processus d'oxydation qui a rendu au fer ses valences de coordination, alors que, dans l'autre cas il s'agit d'un processus réducteur.

Il est nécessaire, pour obtenir une réaction totale, de faire agir une molécule et demie de peroxyde par atome de fer. La méthb est donc oxydée par un équivalent de peroxyde (une demi molécule) en un dérivé d'oxydation supérieure qui à son tour fixe une molécule de peroxyde. Cependant, on observe, dans ce cas, une modification du dernier spectre décrit et les trois bandes diffuses obtenues sont situées sensiblement aux mêmes longueurs d'onde que celles du dérivé qui résulte de l'action directe du peroxyde sur l'oxyhémoglobine ; toutefois, nous observions alors des bandes nettement séparées, alors qu'avec la Méthb le spectre est très diffus. Nous expliquons l'évolution des nouvelles bandes spectrales au cours de leur formation par la substitution partielle de l'oxygène au peroxyde, fixé tout d'abord sur le dérivé d'oxydation de la Méthb. On aurait donc la réaction :



et finalement l'équilibre :



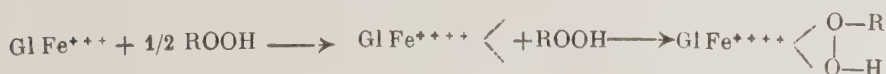
b) L'étude colorimétrique de la réaction, conduite selon la technique ci-dessus décrite, montre que le virage de la coloration du brun ou rouge-violacé est instantanée (fig. 24). Avec 0,75 mo-



FIGURE 24.

Intensité du dérivé rouge-violacé formé par action de H_2O_2 sur la Méthb.

lécule de peroxyde par atome de fer de la Méthb, la coloration rouge-violacée est à peu près la même que pour une molécule et une molécule et demie. Il y a donc avec les résultats spectrographiques une discordance, qui peut s'expliquer si l'on admet que dans un premier temps il y a formation d'un dérivé d'oxydation et rétablissement des valences de coordination, qui fixent alors une molécule d'oxygène ou de peroxyde :



Le composé ainsi formé est de même coloration et présente la même instabilité dans la zone de pH 4 que celui formé à partir de l'oxyhémoglobine. Il se transforme, en l'absence de substrat, en Méthb.



Cette transformation est d'autant plus rapide qu'elle se fait en l'absence d'oxygène et elle a lieu après utilisation totale du peroxyde introduit. En présence d'un substrat tel que l'acide ascorbique, il y a réduction de ce dérivé en fer divalent selon la réaction (fig. 20).



L'équilibre entre l'oxyhémoglobine et le dérivé d'oxydation supérieure en présence d'un substrat oxydable est véritablement caractéristique du mécanisme de l'oxydation peroxydasique de l'oxyhémoglobine. Nous avons en effet montré précédemment que la réaction peroxydasique de l'oxyhémoglobine est liée à l'existence de ce dérivé et que sa vitesse est conditionnée par son instabilité.

III. Etude spectrographique et colorimétrique de l'action du ferricyanure et du peroxyde sur COHb.

L'oxyde de carbone retarde l'action peroxydasique de l'hémoglobine. On peut confirmer ces résultats colorimétriquement et spectrographiquement.

a) Quand on fait agir le ferricyanure sur une solution de HbCO en présence d'oxyde de carbone, les deux bandes caractéristiques de la Méthb apparaissent presque simultanément ; mais elles n'acquièrent leur intensité maximum qu'au bout de plusieurs heures. Le déplacement lent et progressif de l'oxyde de carbone est donc parallèle à la transformation du fer divalent en fer trivalent.

Avec le peroxyde, on observe l'apparition graduelle de la bande caractéristique de l'oxydation du fer ; celle-ci est concomitante à une modification des bandes de la carboxyhémoglobine, qui deviennent diffuses et dissymétriques. Il y a addition et ensuite substitution de peroxyde à l'oxyde de carbone, quand il a réussi à forcer le passage pour atteindre l'atome de fer (fig. 21).

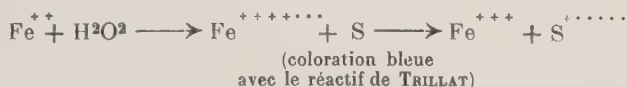
b) Colorimétriquement, l'apparition de la coloration violacée, indice de la formation de dérivé d'oxydation supérieure, est re-

tardée. Elle ne débute, quand on opère dans une atmosphère de CO, qu'après 45 à 60 secondes. Mais dès que le virage apparaît, il évolue très rapidement et la teinte violacée est, au bout de quelques secondes, aussi intense que celle du témoin.

Action catalytique de l'ion ferreux.

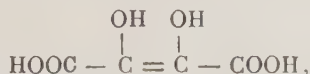
Il est intéressant de comparer le mécanisme d'action des peroxydases avec l'action peroxydante transitoire des sels ferreux. Sans entrer dans le détail d'expérimentation, nous envisagerons seulement les trois observations suivantes (J. D. STIRLING [88]) :

1° Alors que les sels ferriques catalysent très faiblement l'oxydation de l'acide formique par le peroxyde d'hydrogène, les sels ferreux activent considérablement cette réaction pendant un temps très court. En outre, en présence du réactif de TRILLAT (tétraméthylaminodiphénylméthane), les sels ferreux donnent une coloration bleue transitoire qui serait en rapport avec la formation d'un dérivé d'oxydation supérieure du fer. Cette coloration n'a pas lieu quand on remplace le sel divalent par un sel ferrique ou bien quand on ajoute le réactif de TRILLAT après mélange préalable du sel ferreux et du peroxyde. Le schéma suivant objective la réaction

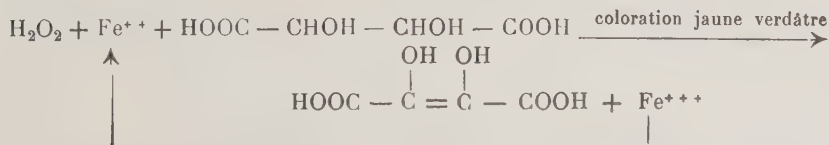


La réaction est irréversible et l'action peroxydante est due à la formation du peroxyde de fer intermédiaire.

2° Si l'on prend comme substrat l'acide tartrique, la catalyse se prolonge très longtemps (FENTON) et l'on observe l'apparition d'une coloration jaune verdâtre en rapport avec le même dérivé qui donne la coloration bleue avec le réactif de TRILLAT. Dans ce cas, le substrat oxydé, l'acide dioxymaléique



réduit le sel ferrique en sel ferreux et la réaction se poursuit selon le schéma :



Ces deux tests mettent en évidence toute la différence qui sépare la catalyse peroxydante (de STOECKLIN) du catalyseur de

peroxydation. Dans le cas des sels ferreux, la transformation du dérivé d'oxydation supérieure en sel ferrique est irréversible. *Avec les peroxydases ou l'hémoglobine, il y a équilibre entre le composé instable et la forme initiale du catalyseur. Cet équilibre conditionne la durée et la régularité de la réaction peroxydase.* Mais le processus de la catalyse est bien le même dans les deux cas.

Nous avons vu que si l'on considère l'oxydation de l'acide iodhydrique par un peroxyde activé par l'hémoglobine, on obtient des résultats différents selon que l'on est en présence ou en l'absence d'un réducteur. Sans réducteur, le pH optimum du système est compris entre 5,5 et 6 ; il se situe à 3,7 quand on introduit un réducteur dans le milieu, étant dévié vers la zone d'instabilité maximum du dérivé d'oxydation supérieur ; et le coefficient d'activation de la réaction passe de 8 à 30 ou à 40, selon le réducteur employé qui a un double rôle :

1° celui de permettre l'utilisation du dérivé d'oxydation supérieure dans la zone de son instabilité maximum ;

2° celui d'en régulariser le fonctionnement et de le préserver contre son auto-oxydation, qui est instantanée en l'absence de réducteur.

Il est remarquable de constater que le pH optimum des peroxydases végétales est justement situé entre 3,7 et 4 quand l'acide iodhydrique est le substrat. Aussi peut-on concevoir que la fraction active de cet enzyme est constituée par une porphyrine ferrique en liaison avec un groupement réducteur.

Conclusions générales.

L'étude du dérivé d'oxydation supérieure de l'hémoglobine permet de comprendre le mécanisme de l'activation des peroxydes par la porphyrine ferrugineuse, fraction active des peroxydases. Obtenu soit à partir de la Méthb soit à partir de l'oxyhémoglobine, il a les propriétés suivantes :

1° Il est de coloration rouge-violacée.

2° Il est réduit instantanément par les réducteurs forts (hydrosulfite) en hémoglobine réduite. Il oxyde l'acide ascorbique, la cystéine et le glutathion, comme la Méthb, et dans les deux cas, les pH optima sont situés au même niveau, la différence portant uniquement sur la vitesse de la réaction, qui est beaucoup plus grande avec le dérivé d'oxydation supérieure.

3° La catalase est sans action sur lui.

4° Il a conservé les valences de coordination de l'hémoglobine et peut fixer, soit une molécule d'oxygène, soit une molécule de

peroxyde ; dans les deux cas on obtient la même coloration et des spectres très voisins.

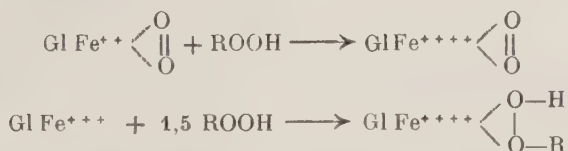
5° Il est très instable, et d'autant plus que la température se rapproche de 40° et le pH de 4.

6° Il présente le même spectre et la même coloration, quel que soit le peroxyde qui lui a donné naissance.

7° Il se transforme irréversiblement en méthémoglobine, et sa vitesse de transformation est fonction du pH et de la température.

8° En présence d'un substrat, il est en équilibre avec l'oxyhémoglobine.

9° Son étude spectrographique, associée à son étude colorimétrique et manométrique, permet d'établir que sa transformation est complète quand une molécule de peroxyde réagit sur un atome de fer de l'oxyhémoglobine ou quand une molécule et demie réagit sur la méthémoglobine. Ce dernier composé est plus instable et plus actif que le précédent, le fer étant immédiatement en contact avec la molécule de peroxyde. Ceci explique que l'action peroxydasique de la méthémoglobine soit supérieure à celle de l'oxyhémoglobine :



10° Il ne présente pas de bandes spectrales caractéristiques, mais s'individualise par la coexistence des bandes de l'oxyhémoglobine et de la bande située dans le vert de la méthémoglobine, caractéristique de l'oxydation du fer de la molécule, alors que la bande dans le rouge et la transparence dans le jaune de la méthémoglobine témoigne de la perte des valences de coordination.

Il se dégage de ce travail que les peroxydes ne sont pas des agents méthémoglobinisants, mais transforment l'hémoglobine en un dérivé d'oxydation supérieure qui a conservé la propriété essentielle de ce chromoprotéide : celle de donner des composés d'addition. Ce dérivé est responsable de l'action peroxydasique du pigment sanguin.

Le fonctionnement des peroxydases semble ainsi s'expliquer par la formation d'un dérivé d'oxydation instable, par action du peroxyde sur la fraction ferrugineuse de l'enzyme. Ce dérivé ne diffère de la méthémoglobine que par une activité et une instabilité plus grandes. Son action est diminuée par CO, CNH, et an-

nulée par H_2S , ce qui rapproche les peroxydases des oxydases. Il y a donc lieu de penser que le mécanisme d'action de ces enzymes est semblable mais que la substance activée est l'oxygène dans un cas et le peroxyde dans l'autre. La classification classique, étayée par les travaux de WARBURG, selon laquelle oxydases et peroxydases font partie d'un même groupe, semble donc devoir être maintenue.

CHAPITRE III.

Peroxydases animales. Leur spécificité et leur rôle biologique.

Il existe dans le sang humain, en dehors de l'hémoglobine qui est la peroxydase animale de beaucoup la plus importante :

1° *Une hydroalcoyloperoxydase plasmatique qui se différencie de l'hémoglobine par sa spécificité plus grande vis-à-vis des hydroperoxydes d'alcoyle et par la cinétique et le pH optimum de son action catalytique.*

2° *L'hydroperoxydase des globules blancs qui semble identique à la peroxydase du lait.*

3° *Une substance liée aux matières protéiques qui potentialise l'action peroxydasique de l'hémoglobine et déplace son pH optimum de 5,6 à 4,4. Cet activateur n'est pas spécifique vis-à-vis d'une espèce d'hémoglobine.*

L'action peroxydasique de l'hémoglobine peut être utilisée biologiquement à des fins d'oxydation. L'oxyhémoglobine, à une tension d'oxygène déterminée, fait fonction d'accepteur d'hydrogène et se transforme en un dérivé d'oxydation supérieure. On peut ainsi transposer in vivo le système peroxydasique que nous avons établi précédemment.

Maints travaux discutent la présence des hydroperoxydases dans les tissus animaux. Ces enzymes, donnant les mêmes réactions qualitatives que l'hémoglobine, posent un problème biologique qui n'est pas encore complètement résolu. Cependant il existe de nombreux arguments en faveur de leur existence propre.

La seule hydroperoxydase animale dont on puisse obtenir une préparation active est celle du lait. Elle fut mise en évidence qualitativement par la réaction de BOURQUELOT (oxydation de l'eau gaïacolée par l'eau oxygénée) ; et MM. MARFAN, P. J. MESSARD et SAINT GIRONS [63] ont montré que le pus donnait la

même réaction jetant ainsi les bases d'un peroxydodiagnostic pouvant suppléer au cytodiagnostics. BATELLI et STERN [14] pensaient trouver dans l'oxydation de l'acide formique par l'eau oxygénée la preuve de l'existence de la peroxydase dans tous les tissus animaux. Ils différenciaient encore l'action de l'hémoglobine de celle de ces enzymes par l'optimum de la température. En réalité, leurs résultats sont fort critiquables et K. A. C. ELLIOTT [28 b] a récemment montré que l'acide formique ne pouvait servir de substrat oxydable et que les résultats de BATELLI et STERN étaient en rapport avec la concentration de l'eau oxygénée. Ces derniers auteurs utilisaient également une méthode basée sur la plus forte dilution d'un extrait de tissu dont une goutte active encore la réaction « hydroperoxyde d'éthyle - acide iodhydrique ». Ils évaluent en fait d'une façon qualitative et irrégulière la teneur des tissus en hémoglobine. Cependant BANCROFT et K. A. C. ELLIOTT [11] réussirent à extraire des quantités appréciables de peroxydases des tissus animaux par la technique suivante : les organes sont perfusés avec une solution de Ringer de façon à les débarrasser de l'hémoglobine. Les coupes lavées sont broyées ; on obtient ainsi deux fractions différentes, l'une soluble, l'autre insoluble dont on évalue l'activité par la méthode de WILLSTÄTTER. Les extraits de pancréas et de poumons sont relativement actifs, ceux du rein et du foie ne contiennent que peu de peroxydases. Les P. Z. sont de l'ordre de $4,7 \cdot 10^{-3}$ à $9,4 \cdot 10^{-3}$ par mg. de tissu.

A. NEUMANN [71] prépare un extrait peroxydasique à partir des leucocytes de la moelle osseuse, dont l'activité disparaît après chauffage à 100° (K. NIKOLAEV [72]) et n'est pas proportionnel à la teneur en fer.

L'activité peroxydasique des tissus est donc très faible et c'est la raison pour laquelle les principales méthodes de recherche sont des méthodes microchimiques. La première est indiquée par FISHEL (1910) qui se servit d'une solution alcoolique de benzidine et mit en évidence des peroxydases non seulement dans les noyaux et le cytoplasme de cellules parenchymateuses variées, mais encore dans le cytoplasme des lymphocytes. N. FIESINGER et L. RUDOUWSKA [32] (1912) réglèrent avec précision une technique microchimique de recherche des peroxydases que GRAHAM [40] (1917) modifia légèrement par la suite. Plus récemment, des auteurs japonais reprirent cette étude avec le réactif au cuivre de SATO et SEKIYA [78].

Nous nous sommes proposés d'étudier comparativement l'action peroxydasique du lait et du sang ; et après avoir décrit les principales méthodes de préparation et de recherche utilisées nous insisterons sur l'intérêt physiopathologique de la recherche qualitative et quantitative des peroxydases et sur leur signification biologique.

I. — Action peroxydasique du lait.

1° RECHERCHE QUALITATIVE.

La présence de peroxydase est en général révélée par la réaction de BOURQUELOT qui permet de différencier le lait cru du lait bouilli. C. STORCH ROTHENFUSSE [77] et G. SCHROETER [82] ont proposé d'autres réactions. Mais le réactif de T. ARAKAWA [2] (mélange à parties égales des réactifs A et B + réactif C) est 64 fois plus sensible que les réactifs de BOURQUELOT et SCHROETER.

2° RECHERCHE QUANTITATIVE DE L'ACTION PEROXYDASIQUE DU LAIT PAR LES MÉTHODES D'ARAKAWA.

Solution A.

Résine de gaïac	0,3	— 1
Acide arsénieux	0,02	
Acide acétique glacial	0,6	
Acétate de soude (3 H ₂ O).....	1,36	
Alcool 99 p. 100 q. s.....	100	cm ³

On broie dans un mortier la résine de gaïac réduite en poudre avec de l'alcool ajouté peu à peu (50 cm³ environ), on transvase l'extrait dans une fiole jaugée de 100 cm³. On ajoute l'acide acétique, l'acétate, la solution d'acide arsénieux et on complète à 100 cm³. Le pH de la solution est de 5. Elle est conservée dans un flacon recouvert de papier noir.

Solution B.

Benzidine	1	
Acétate de soude (3 H ₂ O)	1,36	
Alcool 99 p. 100 q. s.....	100	cm ³

Préparation préliminaire de la benzidine :

On ajoute 20 à 30 cm³ de toluène à 10 g. de benzidine en agitant. On décante le toluène coloré et on répète la même opération jusqu'à ce que la solution décantée soit incolore. On filtre et on dessèche la substance dans un dessiccateur dans l'obscurité.

Solution C.

Teinture vieillie de cantharide, de digitale ou de valériane contenant 50 p. 100 d'alcool et 0,1 p. 100 de peroxyde (1)...	1,0	
Gaïacol	2,0	
Acétone q. s.....	100	cm ³

(1) Ce réactif est préparé à partir d'une teinture officinale dans laquelle des peroxydes organiques se sont formés spontanément par vieillissement (6 mois à 1 an).

a) *Méthode par dilution de ARAKAWA.*

Les réactifs A et C sont utilisés ainsi qu'une solution tamponnée de phosphate à pH 7,8 (PO_4HNa_2 2 H_2O M/15 91,5 cm^3 . $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ M/15 8,15 cm^3).

10 tubes à essai et 5 cm^3 de lait sont nécessaires pour la mesure. Dans chaque tube on introduit 1 cm^3 de la solution de phosphate. Dans le tube 1, 1 cm^3 de lait ; on mélange et on prélève 1 cm^3 que l'on porte dans le tube 2 et ainsi de suite dans une série de neuf tubes de façon à obtenir des dilutions de 1 à 1/256. Le 10^e tube reçoit 1 cm^3 d'eau distillée et dans chacun des tubes on ajoute 0,25 cm^3 du mélange à parties égales du réactif A et C. La lecture des résultats est faite chaque minute pendant 5 minutes. Le lait humain présente des variations individuelles importantes : le lait hyperperoxydasique donnera une coloration instantanée dans les premiers tubes et les tubes 8 et 9 seront positifs avant 5 minutes. Le lait normal donnera une coloration avant 1 minute dans les premiers tubes et les tubes 6 et 7 deviendront positifs. Avec le lait hypoperoxydasique, seuls les numéros 2-3-4 et 5 deviendront positifs.

b) *Méthode de détermination clinique de T. ARAKAWA.*

Les solutions utilisées sont le réactif A, le réactif C et la solution de phosphate à pH 7,8. La réaction est faite dans un tube à essai en mélangeant successivement 1 cm^3 de lait, 3 cm^3 de phosphate, 1 cm^3 de réactif A et 1 cm^3 de réactif C. La coloration bleue se développe instantanément.

Lait de femme	Réaction instantanée	Après 1 m.
—	—	—
1° Lait aperyxydasique	—	—
2° Lait hypoperoxydasique	—	±
3° Lait normoperoxydasique.....	—	++
4° Lait hyperperoxydasique.....	+	+++

Selon ARAKAWA un lait humain normoperoxydasique est un bon lait et la diminution ou l'absence des réactions précédentes est un signe d'avitaminose B. Ainsi que SATO l'a établi :

Lait aperyxydasique = Lait — Vitamine B + a (a étant un poison).

VOGT MOLLER en 1931 pense que le méthylglyoxal est la substance a. T. ARAKAWA [2] montre le parallélisme existant entre l'intensité de la réaction peroxydasique et la substance en question. Il s'agit donc dans l'avitaminose B, non pas d'une diminution de la peroxydase du lait, mais d'une inhibition de cet enzyme.

3° SPÉCIFICITÉ DE LA PEROXYDASE DU LAIT VIS-A-VIS DU SUBSTRAT ET DU PEROXYDE.

Méthode de préparation de la peroxydase du lait.

Nous avons employé la méthode de TURLOW modifiée par K. A. C. ELLIOTT.

A huit litres de lait frais on ajoute 2.000 g. de sulfate d'ammonium ; après dissolution et filtration on dissout dans le filtrat (7.350 cm³) 1.240 g. de sulfate d'ammonium. Le précipité obtenu représente après dessiccation 20 g. d'une poudre blanche dont l'activité peroxydasique est évaluée en P. Z. à 4,7 par mg.

M. DIXON [27] établit que les persulfates peuvent être substitués à l'eau oxygénée dans la réaction d'oxydation du gaïacol catalysée par la peroxydase du lait. Par contre, les peroxydases végétales n'activent pas les persulfates. L'activité d'une préparation de peroxydase du lait évaluée en U. I. a. ou en P. Z. établit la spécificité de cet enzyme à l'égard de l'eau oxygénée en opposition avec l'activation très faible de l'hydroperoxyde d'éthyle et du manque d'activation total de l'hydroperoxyde de méthyle (Tableau XIV et fig. 25).

T. ARAKAWA et SATO [3] ont montré que les peroxydes qui se formaient dans les teintures vieilles de digitale, de cantharide de valériane, de colchique, etc. donnaient en présence de leur réactif une réaction positive avec la peroxydase du lait et négative avec l'hémoglobine.

TABLEAU XIV.

Activité de la peroxydase du lait.

	PZ H ₂ O ₂	PZ C ₂ H ₅ OOH	UIa H ₂ O ₂	UIa C ₂ H ₅ OOH	UIa CH ₃ OOH	H ₂ O ₂ UIa UIT	C ₂ H ₅ OOH UIa UIT	C ₄ H ₉ OOH UIa UIT
1 mg peroxydase du lait	2,4	0,2	2,4	0,15	0,15	6,6	1,7	1
1 cm ³ plasma sanguin	> 0	> 0	1,2	3	3	2	33	16

Spécificité à l'égard du substrat (K. A. C. ELLIOTT).

La peroxydase du lait catalyse l'oxydation de l'acide iodhydrique, des nitrites, du tryptophane, des diamines (ortho et para-phénylène diamine) de la benzidine, des substances phénoliques (sauf le résorcinol qui inhibe l'enzyme). Par contre, la peroxydase du raifort n'active pas l'oxydation du nitrite et du tryptophane, mais active celle du résorcinol. Dans les deux cas, l'acide ascorbique, le glutathion, et la cystéine ne sont pas oxydés.

pH optimum. — ABEL situe celui-ci dans le cas de l'oxydation de l'acide iodhydrique à 4,5, chiffre que nous avons confirmé au cours de nos expériences. La figure 26 montre que chez l'homme ce pH optimum permet de différencier la peroxydase du lait de l'hémoglobine et de celle que nous avons décelée dans le plasma. Selon WILLSTÄTTER, il serait situé à 3,9 quand le vert de malachite est le substrat employé.

Action de la température. — D'après MARFAN la peroxydase est détruite par chauffage à 78° et l'optimum de température est compris entre 40 et 50° ; un chauffage à 60° pendant 20 minutes diminue considérablement son activité (G. SPITZER et M. C. TAYLOR [86]).

En conclusion, peroxydases animales et végétales présentent quelques propriétés spécifiques individuelles mais activent, l'une et l'autre, l'eau oxygénée : ce sont donc des hydroperoxydases. La recherche clinique de l'action peroxydasique du lait par la méthode d'ARAKAWA permet de mettre en évidence un état de précarance ou de carence en vitamine B et de connaître la valeur alimentaire d'un lait.

II. — Action peroxydasique du sang.

Nous envisagerons successivement l'action peroxydasique des globules blancs, des globules rouges et du plasma.

1° PEROXYDASES DES GLOBULES BLANCS.

a) Méthode FIESSINGER-GRAHAM.

Réactif :

Alcool à 75 p. 100.....	100 cm ³
Cristaux de benzidine	0,5 g.
Eau oxygénée	0,2 g.

Les cellules sont examinées entre lame et lamelle sans fixation et sont traitées par le réactif précédent. On laisse en contact 15 à 20 minutes, on lave à l'eau et on sèche au papier buvard.

Les auteurs japonais utilisent les deux méthodes suivantes :

b) 1^{re} Méthode de SATO et SEKIYA [78].

Solution A : Sulfate de cuivre à 0,5 p. 100.

Solution B : Ecraser 0,2 g. de benzidine avec quelques gouttes d'eau dans un mortier ; ajouter 200 cm³ d'eau à la température de la chambre. Filtrer et ajouter au filtrat 4 gouttes d'eau oxygénée à 3 p. 100. La préparation est conservée dans un flacon coloré.

Solution C : Solution aqueuse de safranine à 1 p. 100.

Technique. — Sur un étalement frais et sec de sang, appliquer la solution A. La rejeter et appliquer la solution B pendant 2 minutes. Laver à l'eau et ajouter la Solution C. Laver au bout de deux minutes.

c) 2° *Méthode de SATO* [79].

Solution A : Sulfate de cuivre à 10 p. 100.

Solution B : Solution saturée de benzidine à laquelle on ajoute 2 gouttes d'eau oxygénée à 3 p. 100 pour 100 cm³ de la solution.

Solution C : Solution aq. de safranine à 1 p. 100.

Technique. — Appliquer la solution A sur un étalement de sang séché à l'air. Ajouter quelques gouttes de C ; mélanger ; après 4 ou 5 minutes remplacer ce liquide par le réactif B pendant 1 minute, laver et sécher. La réaction peroxydasique caractéristique des éléments myéloïdes sera plus intense et plus nette avec la première méthode de SATO qu'avec la deuxième méthode qui est préférable quand on veut compter les globules nucléaires. Ces deux méthodes donnent les résultats suivants :

1° Polynucléaires neutrophiles.

La coloration des granules peroxydasiques est bleue noire avec la première méthode de SATO et les contours des noyaux colorés à la safranine sont très nets avec sa deuxième méthode.

2° Polynucléaires éosinophiles.

Les granules sont bleus très foncés et des cristaux en forme d'aiguilles poussant en dehors de la cellule donnent une image en « feu d'artifice » caractéristique de ces éléments. Ici encore, la 2° méthode permet d'apprécier les contours des noyaux.

3° Polynucléaires basophiles.

Ces éléments donnent des réactions peroxydasiques presque négatives.

4° Monocytes.

Les granules bleus sont moins foncés que dans les 2 premiers cas et disséminés dans le cytoplasme légèrement coloré en rouge par la safranine.

5° Lymphocytes.

Le cytoplasme apparaît rouge clair et le noyau rouge foncé avec les deux méthodes.

Ainsi les réactions peroxydasiques présentent un intérêt histologique indéniable pour différencier les leucocytes. Il existe entre elles et la granulation neutrophile et acidophile de la cellule un rapport permanent et incontestable (FIESSINGER et MATHIEU). Il est intéressant d'observer que les oxydases et les peroxydases sont constamment associées et localisées dans les mêmes régions de la cellule.

ETUDE PHYSIOLOGIQUE DES RÉACTIONS PEROXYDASIQUES DES LEUCOCYTES.

CHIBA, ABÉ, SUZUKI ont montré que lorsque les mères avaient un lait donnant une réaction d'ARAKAWA négative, leurs enfants, comme les Pigeons B avitaminosés, présentaient une prolongation du temps minimum de la coloration peroxydasique des leucocytes sanguins. On peut donc penser que l'avitaminose B affaiblit la réaction peroxydasique des leucocytes sanguins aussi bien que celle du lait, ce qui est en faveur de l'identité de ces peroxydases. D'après T. SUZUKI et A. TAKAMATSU [92] la substance méthylglyoxalique extraite par l'éther du lait a peroxydasique retarde l'apparition de la coloration qui est portée de 2 à 10 secondes.

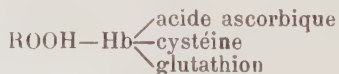
En conclusion, il existe dans les leucocytes une hydroperoxydase dont les propriétés semblent identiques à la peroxydase du lait. Elle est inhibée par le méthylglyoxal et l'intensité de sa réaction diminue dans l'avitaminose B. Cette peroxydase est associée d'une façon constante avec une oxydase. Sa détermination qualitative présente un intérêt diagnostique pour différencier histologiquement les éléments du sang. Sa détermination quantitative peut avoir au cours de certaines affections un intérêt clinique.

2° ACTION PEROXYDASIQUE DES GLOBULES ROUGES.

T. MINAGAWA [65] a étudié histologiquement, par la méthode de SATO, l'action peroxydasique des noyaux des globules rouges de Grenouilles ; la localisation et le degré de développement de ces granules, dans ces cellules, diffèrent suivant leur état de différenciation. Il pense que ces granules sont étroitement apparentés à la formation d'hémoglobine dans les globules rouges.

Nous avons montré précédemment que l'hémoglobine pouvait être considérée, tant par la grandeur que par les modalités de son action catalytique, comme une peroxydase moyennement active et relativement spécifique vis-à-vis des hydroperoxydes d'alcoyle. La figure 25 met en évidence qu'elle active cependant notablement l'eau oxygénée ayant ainsi une action peroxydasique intermédiaire entre celle de l'hydroperoxydase du lait et celle de l'hydroalcoyloperoxydase du plasma.

Son action enzymatique répond au schéma suivant :



L'activité peroxydasique de l'hémoglobine, évaluée en U. I. a. (CH_3OOH) et rapportée à 1 g. de sang, est à 37° supérieure à

1.500 pour le cheval alors que l'activité peroxydasique de 1 gr. de la plante la plus active (raifort) exprimée en U. I. a. (H_2O_2) est inférieure à 1. Le sang est donc le tissu de beaucoup le plus riche en peroxydase et l'hémoglobine la peroxydase animale la plus importante.

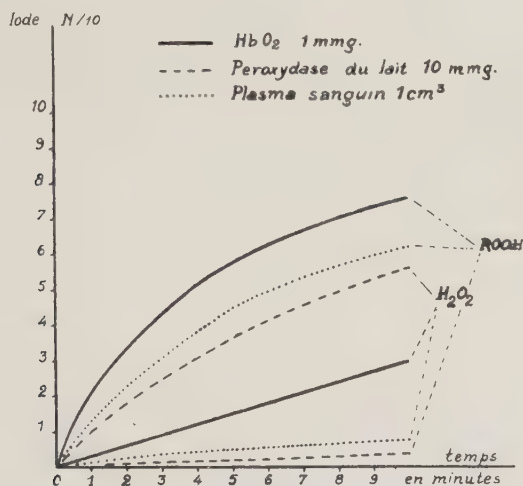


FIGURE 25.

Spécificités comparées des peroxydases du lait, du plasma sanguin et de l'oxyhémoglobine.

3° ACTION PEROXYDASIQUE DU PLASMA SANGUIN.

Hydroalcoyloperoxydase du plasma.

Le problème de l'existence dans le plasma sanguin d'une peroxydase n'était pas encore résolu. BACH et SUBKOWA [9] attribuaient à un enzyme différent de l'hémoglobine l'activité peroxydasique du sang dilué, en se basant sur la thermolabilité de cette dernière par opposition à la thermolabilité de l'hémoglobine. R. WILLSTÄTTER et A. POLLINGER ont établi qu'une telle interprétation ne pouvait être maintenue et que par chauffage, l'hémoglobine perdait les 7/8 de son activité. BACH et KULTJUGIN [8] utilisant la microméthode au gaïacol de BACH et ZUBKOWA montrent que les solutions sanguines de même intensité colorimétrique ont la même action peroxydasique et pensent ainsi donner la preuve qu'il n'existe pas de peroxydase en dehors de l'hémoglobine dans le sang. Cependant A. CASOLARI [22], traitant le sérum par une solution de benzidine, observe le développement d'une coloration jaune ou brune et admet que la peroxydase ainsi mise en évidence peut provenir de leucocytes désagrégés.

Nous avons repris, en utilisant notre méthode de dosage direct, l'étude de l'action peroxydasique du plasma ou du sérum sanguin.

Le prélèvement du sang se fait dans un tube stérile qui contient de l'oxalate et on centrifuge aussitôt afin d'éviter un début d'hémolyse des globules rouges. Ce plasma oxalaté n'active pratiquement pas l'oxydation, par l'eau oxygénée, du gaïacol ou du pyrogallol, à quelque pH que l'on se place. On observe à pH 3 une légère activation de l'oxydation de l'acide iodhydrique. Mais le coefficient d'activation $\frac{U. I.}{U. I. \text{ tem.}} (H_2O_2)$ reste presque toujours inférieur à 2. Par contre si l'on substitue à l'eau oxygénée un hydroperoxyde d'alcyle tel que l'hydroperoxyde d'éthyle ou de méthyle le coefficient atteint environ 7 à 10 pour les plasmas à action peroxydasique moyenne et 25 à 40 pour les plasmas à action peroxydasique forte. Il existe donc dans le plasma sanguin de l'homme une *hydroalcoyloperoxydase* dont le pH optimum se situe entre 2,8 et 3,2 (tableau XV). On retrouve celle-ci dans les plasmas de tous les animaux, mais son pH optimum est variable suivant les espèces. C'est ainsi qu'il se situe à 4,4 pour le plasma de Cobaye et de Coq. Dans le cas du plasma de Lapin le pH optimum est variable selon la présence ou l'absence de l'activateur de HbO_2 . L'action peroxydasique du plasma ne saurait être rapportée à la présence de traces d'hémoglobine pour les raisons suivantes:

1° La spécificité de cette peroxydase vis-à-vis des hydroperoxydes d'alcyle est plus marquée que celle de l'hémoglobine qui active davantage l'eau oxygénée. U. I. CH_3OOH et U. I. C_2H_5OOH sont sensiblement égaux alors que l'hémoglobine active davantage CH_3OOH .

TABLEAU XV.

Activité peroxydasique de 1 cm³ de plasma sanguin exprimée en U. I. (C_2H_5OOH) en fonction du pH.

	Homme	Singe	Cheval	Plasma Lapin activant Hb	Plasma Lapin sans activateur	Cobaye	Coq
pH 2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3
pH 2,7	1,8	1,3	4,1	1,3	1,3	0,9	0,2
pH 3,1	2,35	1,5	4,7	1,5	1,65	1,4	0,2
pH 3,8	1,75	1,2	4,3	1,5	2,55	1,6	0,5
pH 4,4	1,15	0,8	3	0,8	1	2	0,9
pH 5,2	0,8	0,5	0,7	0,5	0,6	1,75	0,75
pH 5,8	0,5	0,3	0,5	0,3	0,4	1,2	0,55
pH 7	0,2	0,2		0,2	0,2	0,2	0,2

2° Son pH optimum est situé à 3 pour le plasma de l'Homme alors qu'à ce pH, l'activité peroxydasique de l'hémoglobine est nulle.

3° La libération d'iode par le système ROOH-plasma-IH est régulière et continue. Le catalyseur n'est donc pas inhibé par l'iode comme dans le cas de l'hémoglobine et on trouve les mêmes chiffres en titrant progressivement l'iode libéré ou en effectuant le dosage au bout de 5 minutes. La figure 25 montre que la cinétique du système s'inscrit selon une droite comme celle des peroxydases végétales. D'autre part, son activité n'est pas augmentée par les réducteurs biologiques et les chiffres trouvés en présence d'acide ascorbique ou de cystéine sont légèrement inférieurs à ceux que l'on obtient par dosage direct : $U. I. < U. I. a.$

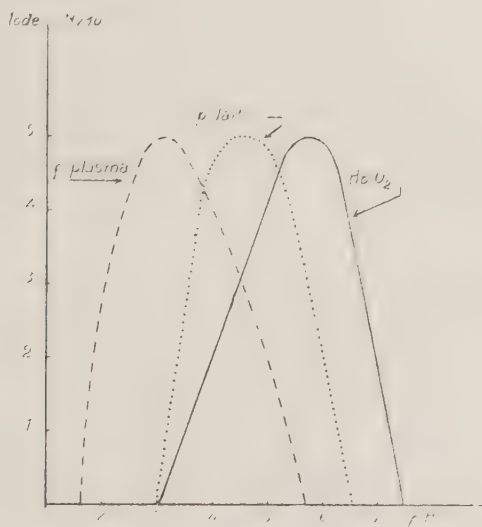


FIGURE 26.

pH optimum des systèmes Peroxyde—Peroxydase—IH.

4° La peroxydase plasmatique est incapable d'oxyder ces réducteurs biologiques ; mais elle peut être mise en évidence en employant à pH 3-3,5 un substrat tel que la benzidine, la teinture de gaïac, la phénolphtaléine réduite etc... Cependant elle n'active que lentement l'oxydation des phénols.

5° L'hydroalcoyloperoxydase du plasma est thermolabile et est précipitée par les sels neutres à saturation, tels que le sul-

fate d'ammonium ou le sulfate de magnésium ainsi que par les agents de défécation du sang.

Son activité est exprimée en U.I. à 23° selon la méthode indiquée page 8. On mesure 1 cm³ de plasma et on dose au bout de 5 minutes par de l'hyposulfite N/100 la quantité d'iode libérée par le système C₂H₅OOH-plasma-IH. à pH 3 (500 cm³ de citrate monosodique M/20 + 500 cm³ d'acide citrique M/20).

On peut donc dire qu'il existe dans les tissus animaux 3 sortes de peroxydases :

1° les hydroperoxydases, dont le type est celle du lait mais que l'on rencontre également dans les leucocytes et les différents tissus. Elles ont des propriétés très voisines de celles des peroxydases végétales : U. I. = U. I. a.

2° les hydroalcoyloperoxydases, que l'on rencontre dans le plasma sanguin et qui, comme leur nom l'indique, activent d'une façon spécifique les hydroperoxydes d'alcoyle : U. I. > U. I. a.

3° L'hémoglobine, qui est de beaucoup l'enzyme peroxydasique animal le plus important. Elle occupe par sa spécificité, une place intermédiaire entre les deux enzymes précédents, et se différencie complètement de l'un et de l'autre par la cinétique de son action qui est influencée par le pouvoir réducteur du milieu : U. I. < U. I. a.

ACTIVATEUR PLASMATIQUE DE L'ACTION PEROXYDASIQUE DE L'HÉMOGLOBINE.

Nous avons cherché s'il existait dans le plasma oxalaté de l'Homme et des différents animaux une substance jouant vis-à-vis de l'hémoglobine le même rôle que l'acide ascorbique et ayant sur son action peroxydasique une double influence : d'une part, en augmentant l'activité et d'autre part en portant son pH optimum vers l'acidité. Nous avons utilisé la technique suivante :

On introduit dans une capsule maintenue à la température de 23° : 0,2 cm³ d'hémoglobine M/2.000 (soit 1,7 mg.), 0,1 cm³ de plasma oxalaté. Après mélange on ajoute 10 cm³ de citrate M/20 à différents pH, 3 cm³ d'iodure M/10, 5 gouttes d'empois d'amidon à 5 p. 100 et 1 cm³ d'hydroperoxyde d'éthyle N/10. L'iode libéré est titré au bout de 4 minutes 15 secondes par de l'hyposulfite N/100 de façon à terminer le dosage à 5 minutes. On fait simultanément 3 témoins au même pH, l'un sans catalyseur, le deuxième avec 0,1 cm³ de plasma, le troisième avec 0,2 cm³ d'hémoglobine M/2.000.

TABLEAU XVI.

Présence dans le plasma sanguin de l'Homme d'une substance activant l'action peroxydasique de HbO_2 .

		I dosé au bout de 5 min. par l'hyposulfite N/100 (U.I.)			
Plasma	0,1 cm ³	0 cm ³	0,1 cm ³	0	Activation par 0,1 cm ³ de plasma
HbO_2 M/2000	0 cm ³	0,2 cm ³	0,2 cm ³	0	
Plasma A.....	0,15	0,6	1,10	0,15	0,50
Plasma B.....	0,22	»	1,62	»	
Plasma C.....	0,30	»	3,85	»	3,10
Plasma D.....	0,35	»	3,15	»	2,35
Plasma E.....	0,15	»	0,70	»	0,10

TABLEAU XVII.

pH optimum de l'activation de HbO_2 par le plasma d'Homme.

Plasma	0,2 cm ³	0 cm ³	0,2 cm ³	0	Activation par 0,2 cm ³ de plasma (U.I.)
HbO_2 M/2000	0 cm ³	0,2 cm ³	0,2 cm ³	0	
pH 3.....	0,7	0,15	2	0,15	1,3
pH 3,7.....	0,5	0,45	3,3	0,15	2,5
pH 4,1.....	0,4	0,60	4	0,12	3,1
pH 4,4.....	0,4	0,70	4,4	0,12	3,4
pH 4,8.....	0,3	0,90	2,9	0,10	1,8
pH 5,2.....	0,3	1,20	1,5	0,10	0,1
pH 5,8.....	0,2	1,40	1,5	0,10	0

On mesure l'activation en retranchant de la quantité d'iode libérée par chacun des systèmes, la quantité libérée par le témoin sans catalyseur (0,15 cm³ I N/100) et l'on soustrait du chiffre obtenu avec le mélange 0,1 cm³ plasma + 0,2 cm³ Hb la somme des chiffres exprimant séparément l'activité du plasma et de l'hémoglobine. Le tableau XVII montre que le pH optimum est situé à 4,4 et que l'activité peroxydasique de 1,7 mgr. d'hémoglobine est multipliée par un coefficient qui varie de 1 à 8 quand on lui ajoute 0,1 cm³ de plasma. Cependant l'activation n'augmente pas proportionnellement, pour une même quantité de plasma, avec la concentration de la solution en hémoglobine et le tableau XVIII indique que, pour la quantité étudiée de plasma, le chiffre maximum de l'activation est obtenu avec 1,7 mg. d'hémoglobine. Cette activation n'est pas spécifique vis-à-vis de l'hémo-

globine d'Homme. On peut également la mettre en évidence à partir de l'hémoglobine de Cheval, de Cobaye, de Lapin, de Coq etc... (tableau XIX). Cependant les chiffres ainsi obtenus varient selon l'hémoglobine envisagée. Le tableau XVI montre que l'activation est aussi variable suivant les plasmas. Rapportée à 0,1 cm³ de plasma, elle oscille entre 0,1 et 3,1 et se situe normalement entre 0,3 et 0,8, augmentant ou diminuant dans les cas pathologiques.

TABLEAU XVIII.

*Activateur du plasma.**a) variation de la quantité d'Hb.*

0,x cm ³ Hb M/2000	0,2 cm ³ plasma (U.I.)	0,x cm ³ Hb M/2000 (U.I.)	0,2 plasma 0,x Hb M/2000 (U.I.)	Activation (U.I.)
0,05	0,5	0,30	1,50	1,05
0,10	—	0,50	2,45	1,90
0,20	—	0,65	3,65	2,85
0,30	—	0,72	3,72	2,85
0,40	—	0,78	3,90	2,95
0,50	—	0,84	3,95	2,95
0,60	—	0,95	4,00	2,90

b) variation de la quantité de plasma.

0,x cm ³ plasma	0,x cm ³ plasma (U.I.)	0,2 cm ³ Hb M/2000 (U.I.)	0,2 Hb M/2000 0,x plasma (U.I.)	Activation (U.I.)	Activation par 0,1 cm ³ de plasma
0,05	0,20	0,9	1,90	0,95	1,90
0,10	0,20	—	3,05	2,10	2,10
0,20	0,27	—	4,42	3,40	1,70
0,30	0,32	—	5,45	4,25	1,45
0,40	0,35	—	6,40	5,30	1,30
0,50	0,40	—	6,95	5,80	1,16

TABLEAU XIX.

Absence de spécificité de l'activateur du plasma vis à vis de l'hémoglobine.

Hb	0,1 cm ³ plasma d'homme (U.I.)	0,2 cm ³ Hb M/2000 (U.I.)	0,2 cm ³ Hb 0,1 cm ³ plasma (U.I.)	Activation (U.I.)
Homme	0,25	0,9	3,9	2,9
Cheval.....	—	2,7	4,8	2
Lapin	—	1,75	3,75	1,9
Cobaye.....	—	4,00	5,65	1,55
Coq	—	2,5	4,4	1,8

Il existe donc dans le plasma sanguin de l'Homme un activateur de l'action peroxydasique de l'hémoglobine dont l'effet est du même ordre que celui de l'acide ascorbique :

1° Il déplace son pH optimum de 5,5 à 4,4 (tableau VIII).

2° Il rend son pouvoir peroxydasique indépendant de l'iode libéré et le complexe « Hb-activateur du plasma » fonctionne comme une véritable peroxydase. Dans un premier temps de la réaction, il y a fixation de l'activateur sur Hb, et si au lieu d'ajouter le plasma à l'hémoglobine on ajoute l'un à la solution très diluée de l'autre, on obtient des chiffres d'autant plus bas que l'on aura mis en route la réaction plus rapidement. Cette substance est fixée aux matières protéiques du plasma ; car ce dernier, après défécation, ultrafiltration ou coagulation a perdu toute activité. Nous avons observé que, dans les cas où le pouvoir d'activation est faible ou nul, il ne s'agit pas d'une inhibition mais bien d'une absence de la substance responsable ; car en mélangeant un plasma à action activatrice forte à un plasma dépourvu d'activateur, on n'observe pas de diminution du chiffre obtenu avec le premier.

Nous avons recherché si cette substance existait dans les plasmas de différents animaux. Nous l'avons retrouvée chez le Singe le Chien, le Cheval. Mais elle est très faible chez le Bœuf, le Veau, le Mouton, le Porc et nulle chez le Cobaye (tableau XX). Sur 7 Lapins étudiés nous l'avons rencontrée deux fois et dans ces deux cas le pH optimum de l'hydroalcoyloperoxydase était situé à 3 alors qu'il était de 3,8 quand le plasma était dépourvu d'activateur. Le Coq présente un chiffre négatif.

TABLEAU XX.

Recherche de l'activateur de HbO_2 dans le plasma de différents animaux.

	Homme	Singe	Chien	Cheval	Veau	Mouton	Bœuf	Porc	Cobaye	Coq
0,2 plasma . . .	0,3	0,5	0,45	0,6	0,2	0,2	0,3	0,4	0,6	0,35
0,2 HbM/2000..	0,7	0,8	0,85	0,85	2,1	0,8	2,3	0,7	0,65	0,65
0,2 plasma . }	4,4	3,55	3,9	2,2	2,4	1	2,7	1,1	1,2	1,20
0,2 Hb . . . }										
Activation . . .	3,55	2,4	2,75	0,9	0,25	0,15	0,25	0,15	0	—0,65

En conclusion il existe dans le plasma :

1° Une hydroalcoyloperoxydase dont le pH optimum oscille suivant les espèces entre 3 et 4,5.

2° Un « activateur » qui se fixe sur l'hémoglobine pour réaliser un système peroxydasique dont le pH optimum se situe entre 4,3 et 4,5.

L'existence de ce dernier justifie la conception selon laquelle la fraction active d'une peroxydase est constituée par l'association d'une porphyrine ferrugineuse et d'une substance réductrice. Le rôle de celle-ci est de protéger la fraction organométallique contre l'action oxydante du peroxyde, d'en régulariser le fonctionnement catalytique, en la rendant dans une certaine mesure indépendante du pouvoir réducteur du milieu ou du substrat, et enfin, d'utiliser le dérivé d'oxydation supérieure responsable de la catalyse dans une zone de pH où il est très instable. Cet activateur, dans le cas d'une peroxydase végétale (1) est fortement fixé au fer, car seuls les réducteurs forts parviennent à l'en déplacer. Par contre, celui du plasma qui s'additionne sur l'hémoglobine n'exerce aucune influence en présence d'acide ascorbique, de cystéine ou de glutathion par exemple. Il s'agit donc d'une association labile (schéma (2)) :

(1) Peroxydase = Protéine — Porphyrine — Fer — activateur

(2) Globine — Porphyrine = Fer... activateur.

(3) (Peroxydase) Protéine $\text{Fe}^{++} + 1/2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Peroxydase Fe}^{+++} + \text{S} \rightarrow \text{S}^* + \text{Peroxydase Fe}^{++}$

(4) (Hémoglobine) $\text{GFe}^{++} + \text{ROOH} \rightarrow \text{GFe}^{+++} + \text{S} \rightarrow \text{S}^* + \text{GFe}^{++}$

Les schémas (3) et (4) représentent les échanges électroniques des systèmes peroxydasiques en activité d'une peroxydase et de l'hémoglobine.

III. — Rôle biologique de l'hémoglobine.

Nous avons vu que l'action peroxydasique de l'hémoglobine répond à un système d'oxydation bien différent de celui d'une peroxydase végétale. L'existence d'un tel système est liée à celle des peroxydes et elle pose un problème biologique de première importance qui est celui du métabolisme au niveau du sang.

Les biochimistes considèrent actuellement que la seule fonction de l'hémoglobine est de véhiculer l'oxygène des poumons aux tissus et que le sang est un simple transporteur de matériaux, de déchets et de chaleur. Ils ne voient en lui le siège d'aucune réaction de synthèse et lui dénie toute activité enzymatique d'oxydation capable d'utiliser l'oxygène de ses globules rouges. Au point de vue calorifique le sang devrait donc être uniquement considéré comme un système de réfrigération par circulation de liquide dans l'organisme animal.

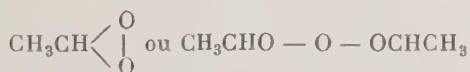
On est cependant frappé par la constance relative de la température malgré le refroidissement intense dont il est l'objet à la périphérie et le seul mécanisme de contact entre les tissus et la

masse sanguine semble être insuffisant pour expliquer son niveau thermique. Mais cette hypothèse est en accord avec les résultats expérimentaux de HARROP (1919), de MORAWITZ (1909) et de WARBURG (1919) d'après lesquels la respiration des globules rouges anucléés est presque nulle. Leurs expériences ont cependant l'inconvénient d'opérer en l'absence de substrat avec des globules rouges plusieurs fois lavés par une solution de RINGER. Il est particulièrement intéressant d'observer que dans un travail plus récent, HARROP et BARRON [43] montrent :

1° que la respiration des globules rouges lavés est appréciable pendant les premières heures.

2° que leur métabolisme est considérablement augmenté par le plasma sanguin.

D'autre part FÜRTH et LIEBEN [37], opérant avec des concentrations plus importantes d'acide lactique, mettent en évidence une action oxydasique des globules rouges de Cheval. G. RAY [75] confirme leurs résultats en étudiant l'oxydation du lactate de soude M/12,5 à pH 6,8 par une suspension de globules rouges dans du sérum physiologique stérile : le taux de production de CO_2 reste constant pendant une période très longue (7 heures 1/2) et le sang noircit par désoxygénation. Il en est tout autrement si l'on remplace les globules par une solution de même titre en hémoglobine. La consommation d'oxygène diminue alors progressivement pour se stabiliser à un taux très bas. Elle n'est absolument pas comparable à celle des globules rouges. La valeur oxydasique de l'hémoglobine est donc due à l'existence de substances réductrices intraglobulaires (glutathion, etc...) qui forment des complexes avec ce chromoprotéide, à moins que, comme le pense IRVING [48], elle ne soit liée à un phénomène de surface en rapport avec la disposition des atomes de fer à la périphérie cellulaire. G. RAY a montré d'autre part, que les produits de dégradation de l'acide lactique diffèrent selon qu'on opère en présence d'un excès d'oxygène ou que la désoxygénation a lieu sous huile. Dans ce dernier cas, l'oxyhémoglobine catalyse la transformation de l'acide lactique en acétaldéhyde qui s'accumule, l'odeur en devenant même perceptible dans certaines expériences. On n'observe pas de formation de méthémoglobine, alors qu'en présence d'oxygène, cette dernière se produit en quantité appréciable et l'acide lactique est complètement oxydé. RAY pense qu'il y a formation intermédiaire à partir de l'acétaldéhyde d'un peroxyde qui terminerait l'oxydation :



On retiendra de ces travaux que la phase oxydative de la dégradation des glucides peut être catalysée par l'hémoglobine.

HARROP et BARON ont établi que cette oxydation est considérablement accrue si l'on ajoute, à la suspension des globules, du bleu de méthylène ou une matière colorante dont le potentiel normal d'oxydoréduction est voisin de 0 (MICHAELIS [64]). Ainsi le système hémoglobine-méthémoglobine peut jouer le rôle de ferment respiratoire et oxyder l'acide lactique en CO_2 et H_2O . Il est, par contre, incapable d'intervenir dans la transformation du glucose en acide lactique. Nous avons établi que le dérivé d'oxydation supérieure de l'hémoglobine effectuait avec une vitesse plus grande toutes les oxydations que catalyse la méthémoglobine. Les expériences de RAY permettent de concevoir que l'oxydation de l'acide lactique par l'hémoglobine va répondre à deux processus différents : dans une première phase il y aurait formation d'un complexe coordinatif analogue à celui que forme le sel ferreux avec l'acide lactique (BAUDISCH et WELO) ; l'acide pyruvique libéré serait décarboxylé par une carboxylase en aldéhyde acétique. Le peroxyde formé à partir de l'aldéhyde mettrait alors en œuvre les propriétés peroxydasiques de l'hémoglobine pour effectuer l'oxydation finale de la molécule organique.

Les expériences de WARBURG comme celles de HARROP et BARON ou de RAY ne tiennent pas compte du fait fondamental que le sang *in vivo* est en contact intime avec des tissus fortement réducteurs et que *in vitro* il perd rapidement son pouvoir réducteur par oxydation des substances réduites du plasma et des globules. On sait quelles précautions il faut prendre pour doser le glutathion réduit ou l'acide ascorbique dans le sang. Si HARROP et BARRON mettent en évidence un métabolisme appréciable du sang répandu, celui-ci est justement en rapport avec le rH du sang qui baisse rapidement en dehors des vaisseaux car, si ce tissu est pourvu d'une activité peroxydasique considérable et d'une activité oxydasique appréciable pour certains auteurs, son pouvoir réducteur est lié aux tissus qu'il baigne. Le comportement du sang à l'égard des agents méthémoglobinisants est en effet complètement différent *in vivo* et *in vitro*. Les biochimistes ont depuis longtemps observé la réduction rapide de la méthémoglobine par les tissus animaux (HAYEM [46] MARCHAND [61] FILIPOWSKI [34] DITTRICH [26] ERHLICH [31] SCHNABEL [80] et ont signalé la résistance considérable de l'organisme à la formation de méthémoglobine. STADIE, injectant à des Lapins, soit du ferri-cyanure soit de la méthémoglobine, observe que 15 à 30 minutes plus tard, il n'y a plus trace de méthémoglobine dans le sang circulant.

D'autre part de nombreux biochimistes ont observé l'oxydation paradoxale de l'hémoglobine par des tissus très réducteurs comme le tissu hépatique par exemple. Il existe dans ce cas un rapport entre la rapidité de cette oxydation et l'intensité du

pouvoir réducteur du tissu considéré, qui réalise également la transformation de l'hémoglobine en méthémoglobine. Ce phénomène mérite d'être étudié en détail car il permet de comprendre le rôle que peut jouer *in vivo* l'action peroxydasique du sang. Nous prendrons comme exemple, l'action de certaines bactéries sur l'hémoglobine. Dès 1895 GILBERT et FOURNIER [39] remarquaient que le développement du pneumocoque sur du sang défibriné de Lapin cause un changement de coloration du milieu qui vire au brun verdâtre ; par examen spectroscopique ils mettent en évidence la formation de méthémoglobine. L'observation est confirmée par GRUTER en 1909 ; en 1913 BUTTERFIELD et PÉABODY [20] en font la première étude quantitative montrant que le principe actif est présent dans les extraits de pneumocoque. Cependant R. COLE [23] en 1914 contredit ces résultats. Ce sont Mc LEOLD et GORDON (1922-23) [58] qui ont expliqué les premiers le mécanisme de cette transformation par production d'un peroxyde par les cultures de pneumocoques et de divers bacilles. En 1924 AVERY O. T. et MORGEN H. J. [4] identifient le peroxyde formé qui est sensible à la chaleur et rapidement décomposé par les solutions alcalines et la catalase. Il s'agit d'eau oxygénée qui transforme l'hémoglobine cristallisée dépourvue de catalase en méthémoglobine.

AVERY O. T. et J. M. NEILL [69] établissent que les extraits stériles de pneumocoques, ne contenant pas de cellules vivantes, effectuent cette transformation. Ces extraits sont préparés à l'abri de l'air à partir de cultures jeunes de pneumocoques en voie de croissance, et cultivées en anaérobiose. La formation de peroxyde résulte de la réaction de l'oxygène moléculaire avec des constituants intracellulaires. Elle a lieu quand on aère les extraits par fixation d'une molécule d'hydrogène sur une molécule d'oxygène selon la réaction établie par TURLow avec la xanthine déshydrase du lait :

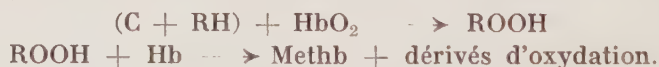


En effet, si on introduit dans le milieu en anaérobiose, un autre accepteur, le bleu de méthylène par exemple on observe sa décoloration par réduction en leucodérivé. Le système diastatique responsable est bien le même dans les deux cas car il est détruit quand on porte l'extrait à 65° pendant 10 minutes. Ce dernier est inactivé dans les deux cas quand il est préparé à partir de pneumocoques lavés par une solution de phosphate. On a ainsi éloigné une substance thermostable indispensable à l'activité du système oxydoréducteur mais qui ne semble pas être spécifique. NEILL et AVERY la représentent par le symbole RH. Dans le corps cellulaire est resté le deuxième facteur qui est thermolabile et très sensible à l'action des oxydants ; ces auteurs le représentent par la lettre C.

J. M. NEILL et O. T. AVERY montrent également qu'il existe une différence essentielle entre les extraits de pneumocoques exposés à l'air et ceux qui sont préparés en anaérobiose : *quand on ajoute à un extrait aéré une solution d'hémoglobine cristallisée dépourvue de catalase, elle est partiellement et rapidement oxydée en méthémoglobine, tandis qu'en présence de catalase, l'oxydation n'a pas lieu. Au contraire, les extraits en anaérobiose, transforment l'hémoglobine aussi rapidement en présence qu'en l'absence de catalase.* Le système diastasique qui effectue cette transformation est le même que celui qui livre l'hydrogène à l'oxygène moléculaire ou au bleu de méthylène. Mais la tension de l'oxygène a une grosse importance comme l'indiquent les chiffres empruntés à NEILL et à AVERY :

Pression O ₂	HbO ₂	Methb formée
0	0	15
20	50 p. 100	168
710	100 p. 100	27

La pression optima est de 20 mm. à laquelle on a une quantité égale d'hémoglobine et d'oxyhémoglobine. On est donc en présence d'un phénomène paradoxal, car sous pression réduite d'oxygène et en présence de catalase, c'est-à-dire dans les conditions où l'eau oxygénée, si elle se formait, serait instantanément détruite, on observe l'oxydation de l'hémoglobine par le même processus que celui qui est mis en œuvre par les peroxydes. NEILL et AVERY [69] interprètent ces résultats expérimentaux en supposant la formation intermédiaire d'un peroxyde organique non détruit par la catalase ; celui-ci durerait le temps du processus d'oxydation du bacille ou de son extrait et se transformerait en présence d'un excès d'oxygène en eau oxygénée :



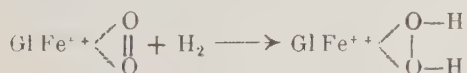
Dans cette réaction, HbO₂ est le donneur d'oxygène et l'hémoglobine réduite est le substrat oxydable. NEILL [68], poursuivant la même expérience sous huile, en anaérobiose, observe que dans une deuxième phase la méthémoglobine est réduite en hémoglobine. Dans tous les cas envisagés : formation d'eau oxygénée, réduction du bleu de méthylène, oxydation de l'hémoglobine, réduction de la méthémoglobine, le même système diastasique (C + RH) détermine la réaction. Il serait donc plus simple de dire que *l'hydrogène mobilisé par le système déhydrase-coferment peut utiliser comme accepteur soit l'oxygène moléculaire, soit le bleu de méthylène, soit l'oxyhémoglobine, soit enfin la méthémoglobine.* Et cette simplification dans le raisonnement permet d'exclure certaines contradictions manifestes de l'interprétation de NEILL et AVERY. On conçoit mal, en effet, que le

peroxyde organique, imaginé par ces auteurs, soit en même temps stable et fugace et se transforme en un peroxyde supérieur en présence d'un excès d'oxygène. Il faudrait admettre que cette transformation fut instantanée. Or en chimie organique, la plupart des peroxydes se préparent à partir de l'eau oxygénée et si la catalase détruit aussi rapidement le peroxyde d'hydrogène c'est en raison de son instabilité et de sa fragilité ; car nous avons observé qu'elle s'attaque également à l'hydroperoxyde d'alcoyle, mais extrêmement lentement. On ne peut donc admettre la réaction : $\text{ROOH} + \text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$ qui du point de vue chimique, thermodynamique et biologique est invraisemblable.

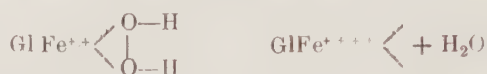
D'autre part, dans la formule : $(\text{RH} + \text{C} + \text{HbO}_2 \rightarrow \text{ROOH} + \text{C})$, qui schématise la formation du peroxyde organique, RH représente le radical du peroxyde et Hb joue le double rôle de donneur d'oxygène et de substrat. En présence de bleu de méthylène ou d'oxygène, RH est le co-ferment indispensable à la mobilisation de l'hydrogène. Or il est bien démontré que le coferment d'une déshydrogénérase est un accepteur d'hydrogène et ne saurait servir à la fois d'accepteur d'hydrogène et d'oxygène. Nous avons d'autre part établi par un faisceau d'arguments chimiques, biochimiques, spectrographiques et manométriques, que l'action d'un peroxyde organique transforme l'hémoglobine non pas en méthémoglobine mais en un dérivé supérieur d'oxydation qui a gardé la propriété de fixer l'oxygène. Ce dérivé se transforme lentement à pH 7 en méthémoglobine et l'oxygène moléculaire le protège contre cette auto-oxydation. Il est évident qu'en présence d'un excès de peroxyde, l'hémoglobine est rapidement dégradée, mais ce n'est pas le cas d'une réaction biologique. KEILIN et HARTREE ont montré d'autre part que, si on fait agir sur de la méthémoglobine un léger excès de H_2O_2 , une molécule et demie de peroxyde réagit instantanément sur une molécule de Methb et seul l'excès de peroxyde qui n'a pas agi, sera décomposé secondairement par la catalase ajoutée à la solution.

DISCUSSION.

Toutes ces raisons permettent d'interpréter différemment les très belles expériences de NEILL et AVERY et de faire jouer à HbO_2 un rôle actif dans la fixation de l'hydrogène mobilisé par le système déshydrogénase du pneumocoque. Dans un premier temps, l'hydrogène se fixerait sur la molécule d'oxygène liée coordinativement au fer du pigment sanguin :



La catalase présente est sans action sur le composé d'addition ainsi formé. Dans un deuxième temps le peroxyde lié oxyde le fer en un dérivé d'oxydation supérieure :



Ce dernier en présence d'oxygène libre et de substrat se transforme en HbO_2 suivant la réaction :



Au contraire à une pression de 20 mm. il va oxyder une molécule d'hémoglobine réduite pour donner naissance à deux molécules de méthémoglobine ;



Les tissus des bactéries ne sont pas les seuls tissus susceptibles d'oxyder l'hémoglobine et de réduire la méthémoglobine ; le fait que l'extrait hépatique réduit la méthémoglobine et oxyde rapidement l'hémoglobine en Mthb et en un dérivé verdâtre, est bien connu. L'intensité de ces deux processus marche de pair. Le foie est le tissu qui réduit le plus rapidement la Méthb ; il est également celui qui oxyde le plus intensément l'hémoglobine. Si on peut dire avec NEILL que la formation de Methb est le premier stade de la dégradation oxydative de l'hémoglobine, précédant son clivage en hématine et en globine, on peut également déduire de l'ensemble de ces expériences que l'activité peroxydasique du sang, qui se chiffre par 1.500 U. I. a. par cm^3 , pourra être utilisée à des fins biologiques. Mais le sang ne possède qu'une partie d'un système d'oxydation dont l'autre partie est à l'intérieur des tissus. Son activité catalytique biologique est donc tributaire de ces derniers qui l'utiliseront selon leurs besoins. En faisant jouer un rôle biologique, non pas seulement à l'oxygène dissous dans le sang, mais également à l'oxygène combiné, on peut rendre compte non seulement de l'action peroxydasique de l'hémoglobine des globules rouges et du muscle, mais encore de celle de la catalase du plasma. Sous une forte tension, l'oxygène dissous va, en effet, en fixant une molécule d'hydrogène, donner naissance à une molécule d'eau oxygénée que la catalase détruira instantanément. Mais quand la tension diminue, l'oxygène fixé sous forme de HbO_2 pourra faire fonction d'accepteur et le peroxyde ainsi formé sera utilisé au cours d'un nouveau processus d'oxydation biologique. Il est impossible actuellement de situer l'importance d'un pareil système d'oxydation. Il permet simplement d'envisager sous un jour nou-

veau le rôle biologique de l'hémoglobine, tant globulaire que musculaire, et d'opposer à la conception physiologique, qui ne voit dans le sang qu'un rôle de transport une nouvelle théorie qui admet :

1° Que la plus grande partie du fer de l'organisme animal, qui existe sous forme d'hémoglobine, a une valeur catalytique indéniabie, qui peut être biologiquement utilisée à des fins d'oxydation par un mécanisme particulier ;

2° Que les peroxydases animales jouent un rôle effectif au cours des processus d'oxydation de l'organisme ;

3° Que la cession de calories à la masse sanguine lors de la traversée d'un organe glandulaire, comme le foie ou le pancréas, ne se fait pas uniquement par un mécanisme de contact lié à la différence de température de ces tissus.

CHAPITRE IV.

Variations individuelles et pathologiques de l'action peroxydasique du sang.

Nous avons recherché si les systèmes peroxydasiques sanguins étaient soumis aux mêmes règles de fixité que les autres éléments du sang et nous avons procédé à l'étude de plus de 150 sangs normaux et pathologiques. Il en résulte que l'activité catalytique de 1 mg. d'oxyhémoglobine d'homme exprimée en U. I. a. est, en général, de 1,9 et que les variations observées entre 1,65 et 2,5 sont en rapport avec différents types d'hémoglobines et n'ont pas de signification pathologique. Au contraire, l'activité de l'hydroalcoyloperoxydase plasmatiche que nous représentons par la lettre A est soumise à des variations individuelles importantes. Les chiffres très bas semblent cependant avoir dans certains cas un intérêt clinique. L'activation de l'action peroxydasique de 1,7 mgr. de HbO_2 par 0,1 cm³ de plasma que nous représentons par la lettre B oscille chez l'homme normal entre 0,4 et 0,8. Ses variations pathologiques sont opposées à celles de A, et B peut dépasser 3 dans certaines affections. La différence A-B toujours positive chez les sujets bien portants devient d'autant plus négative dans certaines maladies que le pronostic est plus défavorable.

I. — Technique du prélèvement du sang.

On prélève, par ponction veineuse, 10 à 15 cm³ de sang dans des tubes à centrifuger, secs et stériles, qui contiennent 2 à 3 cg. d'oxalate de sodium. On agite doucement pendant 30 à 60 secondes de façon à dissoudre l'oxalate sans introduire un agitateur de verre. On centrifuge aussitôt de façon à séparer les globules du plasma oxalaté. Il est préférable dans le cas où l'on ne peut centrifuger immédiatement, de refroidir le sang en portant le tube sous un courant d'eau froide. Dans ces conditions, on obtient un plasma non hémolysé. Les globules sont lavés deux fois avec une solution de NaCl à 9 p. 1000 et laqués par addition

d'une quantité égale d'eau bidistillée tiédie. On laisse reposer et on décante la solution dans un flacon d'Erlenmeyer en évitant d'entraîner le dépôt. Le dosage de l'hémoglobine est effectué selon la technique indiquée page 21. On prépare alors une solution d'hémoglobine M/2000.

II. Activité peroxydasique de l'oxyhémoglobine.

a) DÉTERMINATION DE U. I. a.

Nous avons utilisé la technique décrite page 9 en employant successivement des quantités d'acide ascorbique N/10 de 0.5 cm³, 1,5 cm³ et selon les cas 1,7 à 2 cm³ de façon à obtenir un temps compris entre 2 minutes 30 secondes à 3 minutes et un temps supérieur à 3 minutes. Le dosage se fait à pH 4.4 (850 cm³ de citrate monosodique M/20 mélangés avec 150 cm³ de citrate trisodique M/20, ces solutions étant préparées avec les sels purs du commerce). Le tableau suivant donne les résultats obtenus avec différentes hémoglobines :

Acide ascorbique N/10 en cm ³	HbO ₂ (type courant)	HbO ₂ (type rapide)	HbO ₂ (type lent)
0,5	48''	35''	68''
1	1'50''	1'30''	2' 8''
1,5	2'45''	2'20''	3'20''
1,6	3'20''		
2		3'10''	

L'activité peroxydasique du pigment sanguin exprimée en U. I. a. est rapportée à 1 mg. A 23° elle est voisine de 2 unités avec l'hydroperoxyde d'éthyle. Elle représente dans la majorité des cas une véritable constante situé à 1,9 ($\pm$ 0,5). Nous avons rencontré 10 à 15 p. 100 d'hémoglobine présentant une activité peroxydasique plus forte : U. I. a. = 2,3 à 2,5 et 20 p. 100 avec une activité plus faible (1,65 à 1,75). Le reste s'échelonne entre 2 et 2,3. Nous n'avons pas observé de variations pathologiques des unités peroxydasiques de l'hémoglobine. Les variations sont d'ordre individuel et le chiffre trouvé est caractéristique d'une espèce d'hémoglobine car nous avons constaté, au cours de plusieurs examens chez un même sujet, qu'il était fixe.

b) DÉTERMINATION DE U. I. h.

Par la même technique on note le temps de l'apparition de la coloration bleue de l'empois d'amidon en présence de 2 cm³ d'hyposulfite N/100 à pH 3,7 (solution de citrate monosodique M/20). Le temps trouvé est compris pour 1 cm³ de HbO₂ M/2000 sui-

vant les hémoglobines entre 10" et 18" et se situe le plus souvent à 15".

c) DÉTERMINATION DE U. I.

Elle se fait selon la technique indiquée page 8 en milieu tamponné par une solution de citrate M/20 à pH 5,7 (750 cm³ de citrate monosodique M/20 et 250 cm³ de citrate trisodique M/20). On dose l'iode libéré par de l'hyposulfite N/100 au bout de 4 minutes 30 secondes de façon à terminer le dosage à 5 minutes. Quand on emploie 0,2 cm³ de HbO₂ M/2000 l'iode N/100 libéré est de l'ordre de 0,9 à 1,5 et se situe en général à 1,3.

En conclusion, l'activité peroxydasique de l'hémoglobine est fixe pour un même individu et ne présente aucun intérêt clinique. Il serait cependant intéressant en associant ces différentes méthodes de poursuivre ces recherches sur des sangs de même famille afin de rechercher si l'action peroxydasique de l'hémoglobine peut donner lieu à une application médico-légale.

III. - Activité peroxydasique du plasma sanguin.

a) HYDROALCOYLOPEROXYDASE (A.).

Son activité s'exprime en U. I. et est rapportée à 1 cm³ de plasma. On opère selon la technique indiquée page 8 à pH 2,9-3 (500 cm³ de citrate monosodique M/20 + 500 cm³ d'acide citrique M/20). On introduit successivement 1 cm³ de plasma, 3 cm³ IK M/10, 10 cm³ de citrate pH 3 et 1 cm³ de peroxyde d'éthyle N/10.

b) ACTIVATEUR DU PLASMA (B).

Son activité est également exprimée en U. I. et dosée par la même méthode. On mélange dans une capsule 0,1 cm³ de plasma et 0,2 cm³ de HbO₂ M/2000 ; après quelques secondes on ajoute 3 cm³ IK M/10, 10 cm³ de citrate M/20 à pH 4,4 (850 cm³ citrate monosodique M/20 et 150 cm³ de citrate trisodique M/20) etc...

La même opération est effectuée au même pH d'une part avec 0,2 cm³ de HbO₂ M/2000 et d'autre part avec 1 cm³ de plasma. On retranche des chiffres obtenus la quantité d'iode libérée par la solution témoin sans catalyseur soit 0,1.

Calcul de l'activation par 0,1 cm³ de plasma :

Soit 1,65 cm³ l'iode N/100 libéré par le mélange HbO₂-plasma.

0,65 cm³ l'iode N/100 libéré par 1 cm³ de plasma.

0,75 cm³ l'iode N/100 libéré par 0,2 cm³ HbO₂ M/2000.

En retranchant 0,1 on obtient : 1,55, 0,55, 0,65.

On rapporte à 0,1 cm³ de plasma l'iode libéré par 1 cm³ ce qui donne : 0,055. On additionne les chiffres obtenus séparément avec l'oxyhémoglobine et avec le plasma : $0,65 + 0,055 = 0,705$ et on retranche ce chiffre de celui que donne le mélange HbO₂-plasma : $1,55 - 0,7 = 0,85$.

Dans le cas où l'activation est très faible, on utilisera 0,2 ou 0,3 cm³ de plasma et le chiffre calculé sera divisé par 2 ou par 3. Si au contraire elle est supérieure à 1,5 avec 0,1 cm³ de plasma on emploiera 0,05 cm³ de plasma et le chiffre calculé sera multiplié par 2. Il est recommandable d'employer une solution d'hémoglobine dont l'activité peroxydasique soit comprise entre 1,8 et 2 U. I. a.

Résultats.

a) ETUDE DES VARIATIONS INDIVIDUELLES DE A ET B CHEZ LES SUJETS NORMAUX (Obs. 1 à 30).

L'activité hydroalcoyloperoxydasique de 1 cm³ de plasma évaluée en U. I. est indiquée par la lettre A sur les observations et a une valeur qui oscille entre 0,5 et 3,5 chez les sujets normaux. C'est dire qu'il n'existe pas de chiffre normal et que les variations observées en pathologie ne sauraient donner lieu à une interprétation rigoureuse. Cependant, si l'on jette une vue d'ensemble sur les observations, on constate que si chez les femmes jeunes les chiffres inférieurs à 1 représentent une majorité, au dessus de 30 ans la moyenne s'élève à 1,5. Cette dernière est plus élevée chez les hommes, les chiffres inférieurs à 1 devenant des exceptions, la plupart dépassant 2 le plus souvent. La valeur de l'activation rapportée à 0,1 cm³ de plasma et indiquée par la lettre B sur nos observations, est relativement constante chez les individus normaux. Les chiffres normaux sont compris entre 0,3 et 0,7 et on peut considérer comme pathologique tout chiffre supérieur à 0,9. *Il s'ensuit que la différence A-B est toujours positive chez les individus normaux.*

b) VARIATIONS PATHOLOGIQUES.

1° *Tuberculose pulmonaire* (observations 31 à 43). — Il n'y a pas de proportionnalité rigoureuse entre la grandeur de A et la gravité des lésions. Cependant, quand l'évolution est bien orientée, on ne rencontre des chiffres plus forts que dans les cas désespérés où la valeur de A est voisine de 0. B est, en règle, toujours supérieur à sa valeur normale et peut atteindre 3,5 au cours de certains états cachectiques ; aussi la différence A-B devient-elle fortement négative dans les formes ulcéro-caséuses à pronostic défavorable.

2° *Affections aiguës*. — Dans les bronchopneumonies, A et B sont en général augmentés ; on trouve cependant une différence A-B fortement négative dans un cas à pronostic réservé (obs. 46) alors qu'elle est positive au cours des pneumonies guéries ou à évolution favorable.

Le rhumatisme articulaire aigu et la maladie d'Osler ne donnent pas lieu à des variations importantes.

3° *Cancers*. — Les activités peroxydasiques sont variables mais sont très basses pour A à la période cachectique sauf dans un cas s'accompagnant d'ictère par rétention (obs. 61). B est toujours considérablement augmenté. Il en est de même quand le cancer se complique d'anémie ; A est alors d'autant plus abaissé que la formule sanguine est plus basse. La différence A-B devient fortement négative.

4° *Néphrites azotémiques* (obs. 74 à 84). — D'une façon presque constante, A est abaissé et B augmenté, les différences A-B sont d'autant plus négatives que la formule sanguine est plus anémique et l'état général du malade plus grave. On trouve au cours de néphrites hypertensives et azotémique un véritable parallélisme entre l'état général du malade et les valeurs de A et B.

5° *Cirrhoses* (obs. 85 à 102). — Dans la cirrhose de Laënnec on note une diminution des réactions peroxydasiques portant sur les facteurs A et B. Au contraire ceux-ci sont le plus souvent augmentés au cours des formes avec pigmentation.

6° *Ictères* (obs. 103 à 107). — On ne peut tirer aucune conclusion des chiffres très variables que nous avons obtenus.

7° *Diabètes* (obs. 108 à 119). — L'hydroalcoylperoxydase du plasma a un taux presque toujours élevé. B est également supérieur à la moyenne normale mais la différence A-B reste en général positive.

8° *Suppurations chroniques* (obs. 120 à 124). — C'est dans les suppurations chroniques que nous avons observé pour B les chiffres les plus élevés, et la différence A-B est fortement négative dans les formes à pronostic réservé.

9° *Maladies du sang* (obs. 125 à 149). — Nous avons vu que dans les anémies symptomatiques l'activation de l'hémoglobine par le plasma (B) était en général forte et que le taux de la peroxydase plasmatique était en rapport avec la formule sanguine. Ici encore, les observations montrent que dans l'ensemble les unités peroxydasiques plasmatiques (A) varient dans le même sens que la formule sanguine. Elles sont voisines de zéro dans les anémies de Biermer graves et dans les anémies qui ré-

agissent mal au traitement hépatique ; mais, contrairement aux anémies symptomatique, la valeur de B est toujours faible dans les anémies pernicieuses ; aussi les différences A-B sont-elles voisines de zéro. Dans les polyglobulies A et B ne sont pas modifiés.

Dans les leucocytoses ils sont plutôt augmentés bien qu'il n'y ait pas de relation entre l'augmentation du nombre des globules blancs et les unités peroxydasiques du plasma.

Conclusions.

Les unités d'activité (A) de la peroxydase plasmatique sont sujettes à des variations individuelles importantes. Cependant, elles sont plus élevées chez les hommes que chez les femmes ; A est en général supérieur à 2 chez les hommes et inférieur à 1,5 chez les femmes. Dans différentes maladies, sa valeur semble avoir un intérêt pronostic, des chiffres très faibles étant constamment rencontrés dans les anémies graves, les néphrites azotémiques et presque tous les états cachectiques. L'activation (B) de l'action peroxydasique de l'hémoglobine par le plasma présente des variations pathologiques opposées à celles de A. Situé entre 0,4 et 0,7 chez les individus normaux, B augmente considérablement au cours des suppurations chroniques de la tuberculose, du diabète, des néphrites chroniques etc... Alors que la différence A-B semble être toujours positive chez les individus normaux, elle devient d'autant plus négative que l'état général du malade est plus grave et les chiffres les plus bas sont observés dans les états cachectiques, A devenant voisin de 0 et B pouvant alors atteindre 2,5 à 3.

A est toujours faible dans les anémies graves mais la valeur de B semble pouvoir être un caractère différentiel des anémies pernicieuses et des anémies symptomatiques car elle est voisine de zéro dans les premières et relativement élevée dans les secondes.

L'étude des variations pathologiques des unités peroxydasiques du plasma sanguin ne repose pas encore sur un nombre d'observations suffisant pour donner lieu à des conclusions définitives. Elle permet seulement de penser que les facteurs A et B du plasma peuvent, dans certains cas, avoir une signification pronostique intéressante et leur étude clinique mérite d'être poursuivie.

L'activité peroxydasique de l'hémoglobine est fixe pour un même sujet et se situe le plus souvent à 1,9 unités « U.I.a. » pour 1 mg. de HbO_2 d'homme. Elle n'est pas sujette à des variations pathologiques mais son étude approfondie permettra peut-être de distinguer différentes espèces d'hémoglobine.

OBSERVATIONS.

1. — Sujets normaux.

- Obs. 1.* — M. E. B., 25 ans :
 $A = 3,5$ $B = 0,47$ $A-B = + 3$
U.I.a. (Hb) = 1,85
- Obs. 2.* — M. M. J., 25 ans :
 $A = 2,25$ $B = 0,57$ $A-B = + 1,7$
U.I.a. (Hb) = 1,8
- Obs. 3.* — M. D., 23 ans :
 $A = 3,85$ $B = 0,55$ $A-B = + 3,3$
U.I.a. (Hb) = 1,9
- Obs. 4.* — M. O. V., 21 ans :
 $A = 3,2$ $B = 0,7$ $A-B = + 2,5$
U.I.a. (Hb) = 1,9
- Obs. 5.* — M. R. J., 29 ans :
 $A = 2,4$ $B = 0,7$ $A-B = + 1,7$
U.I.a. (Hb) = 1,85
- Obs. 6.* — M. P. E., 35 ans :
 $A = 2,05$
U.I.a. (Hb) = 1,85
- Obs. 7.* — M. J. S., 47 ans :
 $A = 0,8$ $B = 0,4$ $A-B = + 0,4$
- Obs. 8.* — M. J. B., 54 ans :
 $A = 0,6$ $B = 0,3$
 $A-B = + 0,3$
U.I.a. (Hb) = 1,8
- Obs. 9.* — M. P. M., 28 ans :
 $A = 0,6$ $B = 0,3$ $A-B = + 0,3$
U.I.a. (Hb) = 1,85
- Obs. 10.* — M. G., 38 ans :
 $A = 0,95$
U.I.a. (Hb) = 2,2
- Obs. 11.* — M. B., 50 ans :
 $A = 1,95$
U.I.a. (Hb) = 1,9
- Obs. 12.* — M. M., 40 ans :
 $A = 1,85$
U.I.a. (Hb) = 1,8
- Obs. 13.* — M. M., 50 ans :
 $A = 1,3$
U.I.a. (Hb) = 2

- Obs. 14.* — Mlle G. 32 ans :
 1^{er} examen A = 2 U.I.a. (Hb) = 2
 2^e examen A = 3,1 B = 0,8 A-B = + 2,3
 U.I.a. (Hb) = 2
- Obs. 15.* — Mlle G. H., 37 ans :
 A = 2,1 B = 0,5 A-B = + 1,6
- Obs. 16.* — Mlle M. L. V., 21 ans :
 A = 0,93 B = 0,9 A-B = + 0,3
- Obs. 17.* — Mlle O. B., 18 ans :
 A = 0,5 B = 0,15 A-B = + 0,35
- Obs. 18.* — Mlle M. B., 21 ans :
 A = 0,7 B = 0,7 A-B = + 0,7
 U.I.a. (Hb) = 2,4
- Obs. 19.* — Mlle H., 21 ans :
 A = 2,5 U.I.a. (Hb) = 1,75
- Obs. 20.* — Mme D., 24 ans :
 A = 0,75 U.I.a. (Hb) = 2
- Obs. 21.* — Mlle R. V., 22 ans :
 A = 1,5 U.I.a. (Hb) = 1,85
- Obs. 22.* — Mlle R., 28 ans :
 A = 0,95 U.I.a. (Hb) = 1,85
- Obs. 23.* — Mlle I., 30 ans :
 A = 0,5 U.I.a. (Hb) = 1,75
- Obs. 24.* — Mlle C., 22 ans :
 A = 0,45 U.I.a. (Hb) = 1,8
- Obs. 25.* — Mlle T., 20 ans :
 A = 0,5 U.I.a. (Hb) = 2,3
- Obs. 26.* — Mlle L., 20 ans :
 A = 0,35 U.I.a. (Hb) = 1,95
- Obs. 27.* — Mme G., 32 ans :
 A = 1,6 U.I.a. (Hb) = 2,45
- Obs. 28.* — Mme S., 43 ans :
 A = 1,65 U.I.a. (Hb) = 1,95

Obs. 29. — Mme B., 33 ans :

$$A = 1,75$$

$$\text{U.I.a. (Hb)} = 2$$

Obs. 30. — Mlle C., 15 ans :

$$A = 1,5$$

$$\text{U.I.a. (Hb)} = 2$$

2. — Tuberculose pulmonaire.

Obs. 31. — Mme P. 32 ans : pleurésie gauche en voie d'amélioration.

$$A = 1$$

$$B = 0,65$$

$$A-B = + 0,35$$

$$\text{U.I.a. (Hb)} = 1,7$$

Obs. 32. — M. C., 44 ans : pleurésie en voie de guérison.

$$A = 0,7$$

$$B = 1$$

$$A-B = - 0,3$$

Obs. 33. — M. B., 32 ans : tuberculose ulcéro caséeuse avec expectoration faible

$$A = 0,9$$

$$B = 1,9$$

$$A-B = - 1$$

Obs. 34. — M. L., 35 ans : tuberculose pulmonaire, bon état général, expectoration faible.

$$A = 2,65$$

Obs. 35. — M. H., 25 ans : pleurésie séro fibrineuse ($t^{\circ} 39^{\circ}$)

$$A = 1,45$$

$$\text{U.I.a. (Hb)} = 1,82$$

Obs. 36. — M. K., 36 ans : tuberculose pulmonaire avec expectoration moyenne, état général assez bon.

$$A = 1,5$$

$$\text{U.I.a. (Hb)} = 1,7$$

Obs. 37. — Mme L., 55 ans : tuberculose pulmonaire bilatérale avec assez bon état général.

$$A = 0,5$$

Obs. 38. — M. E., 38 ans : tuberculose ulcéro caséeuse bilatérale avec état cachectique.

$$A = 0,15$$

$$B = 2,1$$

$$A-B = - 1,95$$

Obs. 39. — Mlle J. F., 17 ans : granulie.

$$A = 1,05$$

$$B = 0,85$$

$$A-B = + 0,2$$

Obs. 40. — Mlle C., 38 ans : tuberculose cavitaires bilatérales avec état cachectique.

$$A = 0,2$$

$$B = 3$$

$$A-B = - 2,8$$

Obs. 41. — Mlle P., 48 ans : tuberculose pulmonaire bilatérale avec mauvais état général ($t^{\circ} 39^{\circ}$).

$$A = 0,95$$

$$\text{U.I.a. (Hb)} = 1,8$$

Obs. 42. — Mme F. 47 ans : tuberculose pulmonaire bilatérale avec état cachectique.

$$A = 0,55$$

Obs. 43. — Mme L., 49 ans : polynévrite alcoolique avec tuberculose pulmonaire et mauvais état général.

A = 1,45

U.I.a. (Hb) = 1,75

3. — Affections aiguës.

Obs. 44. — M. B., 45 ans : bronchopneumonie (t° 38°5).

A = 1,2

U.I.a. (Hb) = 1,85

Obs. 45. — M. E. 50 ans : bronchopneumonie.

A = 1,37

B = 1,5

A-B = — 0,13

Obs. 46. — Mme F., 42 ans : bronchopneumonie traînante. Pronostic réservé.

A = 1

B = 2,3

A-B = — 1,3

Obs. 47. — M. G., 30 ans : pneumonie guérie.

A = 1

B = 0,75

A-B = + 0,25

Obs. 48. — Mme L., 54 ans : pneumonie guérie.

A = 1

B = 0,9

A-B = + 0,1

U.I.a. (Hb) = 1,82

Obs. 49. — Mme S., 36 ans : asthme avec bronchite chronique.

A = 2,15

Obs. 50. — Mme V., 53 ans : asthme avec signe de bronchite bilatérale.

A = 1,7

U.I.a. (Hb) = 2,1

Obs. 51. — M. J., 30 ans : rhumatisme articulaire aigu avec pleurésie rhumatismale (t° 39°).

A = 0,45

U.I.a. (Hb) = 0,65

Obs. 52. — Mlle O., 20 ans : rhumatisme articulaire aigu avec bon état général.

A = 1,35

Obs. 53. — M. L., 17 ans : rhumatisme articulaire aigu avec cardiopathie.

A = 1,8

U.I.a. (Hb) = 1,75

Obs. 54. Mme L., 30 ans : rhumatisme articulaire aigu (t° 38°5)

A = 2,9

U. I. a (Hb) = 1,8

Obs. 55. — M. G. maladie d'Osler.

A = 1,25

B = 0,9

A-B = + 0,35

Obs. 56. — Mme H., 34 ans : endocardite mitrale avec état fébrile, splénomégalie et altération de l'état général.

G. R. : 3.200.000

G. B. : 13.400

A = 0,1

Obs. 57. — M. N., 35 ans : maladie d'Osler avec mauvais état général.

G. R. : 1.160.000

G. B. : 5.600

A = 0,65

B = 1,2

A-B = — 0,55

4. — Cancers.

Obs. 58. — M. G., 48 ans : cancer du pancréas avec altération de l'état général.

G. R. : 1.125.000

G. B. : 4.950

A = 0,4

U.I.a. (Hb) = 2,2

Obs. 59. — Mme B., 60 ans : cancer ovarien avec métastase intestinale et état cachectique.

A = 0,35

U.I.a. (Hb) = 1,75

Obs. 60. — Mme M. cancer du péritoine avec mauvais état général.

A = 0,55

Obs. 61. — Mme H. cancer du foie avec ictère très intense et état cachectique.

A = 3,5

Obs. 62. — Mme E., 43 ans : cancer du sein avec métastases cervicothoraciques. Etat général bien conservé.

A = 0,6

U.I.a. (Hb) = 1,9

Obs. 63. — Mme A., 78 ans : cancer secondaire du foie. Assez bon état général.

A = 1,35

Obs. 64. — M. V., 56 ans : cancer de la prostate avec métastases vertébrales. Assez bon état général.

A = 2,05

U.I.a. (Hb) = 1,8

Obs. 65. — Mme B., 77 ans : cancer du colon. Assez bon état général.

A = 1,25

U.I.a. (Hb) = 1,85

Obs. 66. — Mme R., : cancer de l'intestin. Assez bon état général.

G. R. : 3.720.000

G. B. : 4.600

A = 3,35

B = 1,5

A-B = + 1,85

Obs. 67. — Mme R. : cancer du foie. Assez bon état général.

G. R. : 2.900.000

G. B. : 9.000

A = 2,35

B = 1,8

A-B = + 1,55

Obs. 68. — Mme B., 60 ans : cancer de l'intestin.

G. R. : 2.160.000

G. B. : 7.600

A = 0,78

U.I.a. (Hb) = 1,75

Obs. 69. — Mme T., 40 ans : cancer du pylore avec phlemtia alba dolens.

G. R. : 1.980.000

G. B. : 17.400

Myélogramme : Lame très riche hyperplastique avec très grosse réaction myélocytaire.

A = 0,05 B = 2,5 A-B = — 2,45

Obs. 70. — M. P., 70 ans : cancer généralisé avec état cachectique.

G. R. : 1.360.000

G. B. : 8.400

A = 0,1 B = 2 A-B = — 1,9
U.I.a. (Hb) 1,75

Obs. 71. — Mme C., 42 ans : cancer du sein avec bon état général.

G. R. : 2.530.000

G. B. : 5.400

A = 2,8 B = 0,8 A-B = + 2

Obs. 72. — M. F., 78 ans : cancer de la prostate. Mauvais état général.

G. R. : 2.380.000

G. B. : 5.400

A = 0,35

Obs. 73. — Mme B., 60 ans : cancer de l'utérus.

G. R. : 2.160.000

G. B. : 7.600

A = 0,5

5. — Néphrites hypertensives et azotémiques

Obs. 74. — M. D., 15 ans : néphrite avec albuminurie. Excellent état général.

Az. = 0,4 T.A. = 15-8
A = 1,48

U.I.a. (Hb) = 2

Obs. 75. — Mme P., 23 ans : néphrite chronique. Bon état général.

Az. = 0,66 T.A. = 21-11 Albuminurie
A = 0,9

Obs. 76. — M. M., 65 ans : néphrite azotémique hypertensive.

A = 0,8

Obs. 77. — Mme M., 42 ans : néphrite azotémique.

Az. = 0,8 Albuminurie.
A = 0,6

Obs. 78. — M. X., : néphrite hypertensive et azotémique chez un syphilitique.

Az = 0,73 T.A. = 24-15
A = 0,35 B = 1,1 A-B = — 0,75

Obs. 79. — Mme B., 40 ans : néphrite azotémique et hypertensive d'origine gravidique. Excellent état général.

Az = 0,9 T.A. = 19-14
A = 1,9 B = 0,9 A-B = + 1

Obs. 80. — Mme T., 27 ans : anémie avec néphrite azotémique.

$$\text{Az} = 0,91$$

$$\text{G. R.} : 1.800.000$$

$$\text{G. B.} : 9.800$$

$$\text{A} = 0,1$$

$$\text{B} = 1,1$$

$$\text{A-B} = - 1$$

Obs. 81. — Mme C., 57 ans : néphrite azotémique hypertensive avec oedèmes importants et mauvais état général.

1^{er} examen :

$$\text{A} = 0,3$$

2^e examen :

$$\text{A} = 0,15$$

$$\text{B} = 1,2$$

$$\text{A-B} = - 1,05$$

Obs. 82. — M. A., 52 ans : Néphrite azotémique hypertensive, avec mauvais état général.

$$\text{Az} = 0,8$$

$$\text{T. A.} = 25-18$$

1^{er} examen :

$$\text{A} = 0,15$$

2^e examen :

$$\text{A} = 0$$

$$\text{B} = 2$$

$$\text{A-B} = - 2$$

Obs. 83. — M. R., 48 ans : Néphrite azotémique et hypertensive.

$$\text{Az} = 2,10$$

$$\text{T. A.} = 18-8 \frac{1}{2}$$

$$\text{G. R.} : 2.120.000$$

$$\text{G. B.} : 7.400$$

$$\text{A} = 0,25$$

$$\text{B} = 0,9$$

$$\text{A-B} = - 0,65$$

Obs. 84. — M. F., 34 ans : Pyélonéphrite. Excellent état général.

$$\text{A} = 2,4$$

$$\text{B} = 0,8$$

$$\text{A-B} = + 1,6$$

6. — Cirrhoses.

Obs. 85. — Mme L., 44 ans : Cirrhose de Laënnec avec ascite peu abondante et assez bon état général.

$$\text{G. R.} : 4.220.000$$

$$\text{G. B.} : 4.800$$

$$\text{A} = 0,78$$

Obs. 86. — Mlle L., 63 ans : Cirrhose de Laënnec.

$$\text{A} = 1,75$$

Obs. 87. — Mme B. : Cirrhose de Laënnec avec bon état général.

$$\text{A} = 3,15$$

$$\text{B} = 2$$

$$\text{A-B} = + 1,15$$

Obs. 88. — M. G., 47 ans : Cirrhose avec ascite, petit foie, œdèmes des membres inférieurs. Amaigrissement.

$$\text{A} = 0,15$$

$$\text{U. I. a. (Hb)} = 0,75$$

Obs. 89. — M. C., 52 ans : Cirrhose de Laënnec. Mauvais état général.

$$\text{A} = 0,25$$

Obs. 90. — M. D'H. : Cirrhose de Laënnec avec état cachectique.

$$\text{G. R.} : 2.740.000$$

$$\text{G. B.} : 16.500$$

$$\text{A} = 0,1$$

$$\text{B} = 0,9$$

$$\text{A-B} = - 0,8$$

Obs. 91. — M. D. : Cirrhose avec mauvais état général.

G. R. : 2.740.000

G. B. : 16.500

A = 0,35

B = 0,9

A-B = — 0,55

Obs. 92. — M. L. : Cirrhose de Laënnec avec mauvais état général.

A = 0,4

B = 0,9

A-B = — 0,5

Obs. 93. — M. H. : Cirrhose de Laënnec avec mauvais état général.

G. R. : 2.750.000

G. B. : 16.500

A = 0,25

B = 0,4

A-B = — 0,15

Obs. 94. — Mme R., 46 ans : Cirrhose avec ascite de moyenne abondance hépatomégalie et subictère.

A = 0,5

B = 0,8

A-B = — 0,3

Obs. 95. — Mme D., 48 ans : Cirrhose avec état cachectique.

A = 0,65

B = 1,4

A-B = — 0,75

Obs. 96. — M. A. : Cirrhose pigmentaire, hépatomégalie sans ascite.

A : 1,75

U. I. a. (Hb) = 2

Obs. 97. — Mme T. : Cirrhose pigmentaire avec ascite.

A = 3,5

U. I. a. (Hb) = 3,75

Obs. 98. — M. H., 41 ans : Cirrhose pigmentaire avec hépatomégalie et splénomégalie.

A = 2,45

B = 1,6

A-B = + 0,85

Obs. 99. — Mme L., 37 ans : Cirrhose avec légère pigmentation et ascite importante.

A = 0,6

U. I. a. (Hb) = 1,75

Obs. 100. — Mme M. : Cirrhose pigmentaire, bon état général.

A = 0,6

U. I. a. (Hb) = 1,75

Obs. 101. — M. V., 38 ans : Cirrhose avec ictère et tuberculose pulmonaire.

A = 1,55

B = 0,6

A-B = + 0,95

Obs. 102. — M. G., 50 ans : Cirrhose avec hépatomégalie et assez bon état général.

A = 0,85

U. I. a. (Hb) = 1,75

7. — Ictères.

Obs. 103. — M. L., 31 ans : Spirochétose ictéro-hémorragique à la phase préictérique.

A = 1,8

B = 1,5

A-B = + 0,3

Obs. 104. — M. G. : Spirochétose ictéro-hémorragique à la phase ictérique. Amaigrissement important.

A = 0,65

B = 1,8

A-B = — 1,15

Obs. 105. — M. D., 48 ans : Ictère par rétention.

$$A = 1$$

$$U. I. a. (Hb) = 1,75$$

Obs. 106. — M. V., 33 ans : Ictère catarrhal.

$$A = 0,85$$

$$B = 0,6$$

$$A-B = + 0,25$$

Obs. 107. — M. N., 70 ans : Ictère catarrhal.

$$A = 0,45$$

$$B = 1,7$$

$$A-B = - 1,25$$

8. — Diabètes.

Obs. 108. — M. S., 53 ans : Diabétique.

Glycémie : 1,75

Glucosurie : 5,45

$$A = 1,8$$

$$B = 1,2$$

$$A-B = + 0,6$$

Obs. 109. — M. M., 69 ans : Diabète avec légère acidose ; traitement insulínique.

$$A = 1,77$$

$$U. I. a. (Hb) = 1,75$$

Obs. 110. — M. C. : Diabète sans acidose.

$$A = 1,4$$

$$U. I. a. (Hb) = 2,2$$

Obs. 111. — M. S. : Diabète sans acidose.

$$A = 2,3$$

$$U. I. a. (Hb) = 2$$

Obs. 112. — Mme D., 69 ans : Diabétique.

Glycémie : 1,35 g.

Glucosurie : 2,3 g.

$$A = 1,6$$

Obs. 113. — M. R., 55 ans : Diabétique.

Glycémie : 3,48 g.

Glucosurie : 38 g.

$$A = 2,3$$

Obs. 114. — M. D., 66 ans : Diabète sans acidose.

Glycémie : 1,35 g.

$$A = 1,3$$

Obs. 115. — Mme C., 64 ans : Diabète avec insuffisance cardiaque.

Glycémie : 2,57 g.

$$A = 0,85$$

Obs. 116. — Mme B., 55 ans : Diabète et hypertension artérielle.

Glycémie : 1,8 g.

Glucosurie +

$$T. A. \quad 21-5 \quad 10$$

$$A = 0,6$$

Obs. 117. — Mme C. : Diabète équilibré.

$$A = 2$$

Obs. 118. — M. V., 53 ans : Diabète avec pleurésie séro-fibrineuse.

Glycémie : 1,61 g.

$$A = 1,2$$

Obs. 119. — M. D. : Diabète équilibré.

Glycémie : 2 g.

A = 3,25 B = 0,9 A-B = +2,35

9. — Suppurations chroniques.

Obs. 120. — M. O., 32 ans : Abscès du poulmon.

A = 1,1 B = 2 A-B = — 0,9

Obs. 121. — M. B., 39 ans. Fistule pleuropulmonaire.

A = 0,6 B = 2,5 A-B = — 1,9

Obs. 122. — M. H., : Fistule anale suppurant légèrement.

A = 0,75 B = 2,3 A-B = — 1,5

Obs. 123. — M. A., abcès du poulmon.

A = 0,65 B = 2 A-B = — 1,35

Obs. 124. — M. P., 38 ans : anémie secondaire à un abcès streptococcique.

G. R. : 2.300.000

G. B. : 7.200

A = 2,85 B = 3 A-B = — 0,15

10. — Anémies.

Obs. 125. — Mme B., 60 ans : anémie pernicieuse réagissant mal au traitement hépatique.

G. R. : 1.360.000

G. B. : 5.800

1^{er} examen (23 août)

A = 0,2

2^e examen (22 septembre)

A = 0,55 B = 0,2 A-B = + 0,35

Obs. 126. — M. B., 59 ans : anémie pernicieuse traitée.

G. R. : 4.040.000

G. B. : 4.400

A = 0,8 B = 0,8 A-B = 0

Obs. 127. — Mme K., 27 ans : anémie de Biermer, traitée par des extraits hépatiques.

G. R. : 4.950.000

G. B. : 10.800

1^{er} examen (28 août)

A = 0,05

2^e examen (20 septembre)

A = 0,75 B = 0,6 A-B = + 0,15

Obs. 128. — Mme V., 88 ans : anémie de Biermer.

G. R. : 3.510.000

G. B. : 8.800

A = 0,4

U.I.a. (Hb) = 2,1

Obs. 129. — Mme L., 64 ans : cryptoleucémie réagissant mal au traitement.

G. R. : 1.550.000

G. B. : 2.600

A = 0,3 B = 0,6 A-B = — 0,3

Obs. 130. — Mme D., 60 ans : cryptoleucémie.

G. R. : 4.890.000

G. B. : 3.600

A = 2,75 B = 2,25 A-B = + 0,5

Obs. 131. — M. F., 38 ans : erythroblastose avec formule sanguine normale.

A = 2,3 B = 0,5 A-B = + 1,8

Obs. 132. — M. G., 42 ans : erythroblastose aigue avec splénomégalie considérable.

G. R. : 1.900.000

G. B. : 4.000

A = 0 B = 0,1 A-B = — 0,1

Obs. 133. — M. D., 24 ans : hemophilie.

G. R. : 4.410.000

G. B. : 7.200

A = 0,3 B = 0,6 A-B = — 0,3

Obs. 134. — M. P., 58 ans : Anémie hyperplasique chez un malade présentant un tabès fruste.

G. R. : 1.870.000

G. B. : 7.400

A = 0,15 B = 1,2 A-B = — 1,05

Obs. 135. — Mme G., 25 ans : Ictère hémolytique (diagnostic clinique non vérifié).

G. R. : 2.700.000

G. B. : 5.800

A = 0 B = 0,1 A-B = — 0,1

Obs. 136. — M. G. : Syndrome neuro anémique.

G. R. : 4.300.000

A = 3,8

U. I. a. (Hb) = 3,75

Obs. 137. — Mme P. : Anémie à la suite de metrorragies abondantes et persistantes.

G. R. : 2.240.000

G. B. : 11.400

A = 2,8 B = 0,8 A-B = + 2

Obs. 138. — M. de la F., 50 ans : Hémorragies intestinales mal déterminées. Quelques signes hémogéniques. Rate augmentée de volume.

G. R. : 2.074.000

G. B. : 6.800

A = 0,6 B = 0,5 A-B = + 0,1

Obs. 139. — M. L. : Anémie consécutive à des hémorragies intestinales.

1^{er} examen (5 octobre)

G. R. : 2.070.000

G. B. : 7.000

A = 0,05 B = 0,9 A-B = — 0,85

2^e examen (20 octobre)

G. R. : 1.500.000

G. B. : 4.500

A = 0,2 B = 0,8 A-B = — 0,6

Obs. 140. — M. B., 19 ans : Anémie grave d'origine mal déterminée.

1^{er} examen (23 août)

G. R. : 1.000.000

G. B. : 3.000

A = 3,6

2^e examen (12 septembre)

G. R. : 1.440.000

G. B. : 3.800

A = 2,95

B = 2,2

A-B = + 0,75

3^e examen (3 octobre)

G. R. : 1.900.000

G. B. : 4.200

Etat général du malade très amélioré. Température redevenue normale.

A = 1,8

B = 0,9

A-B = + 0,9

Obs. 141. — M. L. : Polyglobulie redevenue normale sous l'influence du traitement.

A = 2,4

B = 0,9

A-B = + 1,5

Obs. 142. — Mme M., 48 ans : Polyglobulie.

G. R. : 8.000.000

G. B. : 7.400

A = 1,2

B = 0,9

A-B = + 0,3

Obs. 143. — M. M. : Polyglobulie.

G. R. : 7.400.000

G. B. : 7.500

A = 3,6

B = 0,6

A-B = + 3

Obs. 144. — M. L., 53 ans : Leucémie lymphoïde.

A = 1,75

B = 0,5

A-B = + 1,25

Obs. 145. — Mlle M., 19 ans : Maladie de Hodgkin.

A = 0,75

U. I. a. (Hb) = 1,9

Obs. 146. — Mme M., 60 ans : Cryptoleucémie lymphatique et splénique.

G. R. : 3.180.000

G. B. : 3.600

A = 0,5

U. I. a. (Hb) = 2,1

Obs. 147. — M. C., 46 ans : Splénomégalie importante.

G. R. : 2.460.000

G. B. : 3.200

A = 0,4

U. I. a. (Hb) = 2,1

Obs. 148. — M. D., 31 ans : Adénopathies multiples avec splénomégalie.

G. R. : 4.526.000

G. B. : 12.500

A = 3,6

Obs. 149. — M. G., 57 ans. Polyadénopathie avec monocytose.

G. R. : 5.720.000

G. B. : 16.400

A = 2,7

Valeur moyenne de A, B et A-B.

	A valeur moyenne	A chiffres extrêmes	B Valeur moyenne	B Chiffres extrêmes	A-B
Hommes bien portants de 20 à 50 ans	2,15	0,6 — 3,85	0,5	0,2 — 0,8	+ 1,65
Femmes bien portantes de 20 à 25 ans	0,7	0,5 — 1	0,58	0,2 — 0,7	+ 0,12
Femmes bien portantes de 30 à 50 ans	2,1	0,8 — 3	0,65	0,5 — 0,8	+ 1,45
Tuberculoses pulmonaires bénignes ou à évolution favorable	0,8	0,5 — 1	0,82	0,65 — 1	— 0,2
Tuberculeux cachectiques	0,2	0,1 — 0,8	2,3	1,9 — 3	— 2,1
Broncho pneumonies et pneumonies	1,2	1 — 1,4	1,36	0,7 — 2,3	— 0,16
Rhumatismes articulaires aigus	1,62	0,65 — 2,9			
Maladies d'Osler	0,9	0,65 — 1,25	1,1	0,9 — 1,2	— 0,42
Cancers	1,36	0,6 — 3,35			
Cancers avec anémie	1,05	0,05 — 2,8	1,8	0,8 — 2,5	— 0,75
Néphrites azotémiques	0,49	0,1 — 1,9	1,1	0,9 — 2	— 0,61
Cirrhoses	0,4	0,1 — 3,15	0,9	0,8 — 2	— 0,5
Cirrhoses pigmentaires	1,74	0,6 — 3,5			
Ictères	1	0,45 — 1,8	1,1	0,6 — 1,8	— 0,1
Diabète	1,7	0,6 — 3,25			
Suppurations chroniques	1,2	0,6 — 2,85	2,35	2 — 3	— 1,15
Anémies pernicieuses	0,44	0,05 — 0,8	0,55	0,1 — 0,8	— 0,46
Polyglobulies	2,4	0,9 — 3,6	0,8	0,6 — 0,9	+ 1,6
Etats cachectiques	0,2	0,1 — 1,5	1,8	1,5 — 3	— 1,6

CONCLUSIONS GÉNÉRALES.

Dans ce travail, nous avons étudié les peroxydases animales au point de vue biochimique et physiopathologique.

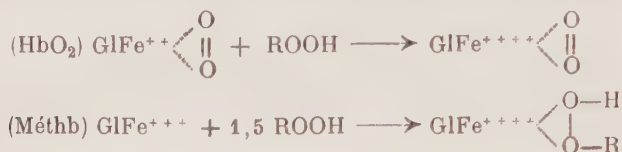
Dans la première partie, nous avons comparé l'activité catalytique de l'hémoglobine à celle des peroxydases végétales en employant la méthode de dosage de WILLSTÄTTER et une méthode iodométrique indirecte que nous avons établie : elle est basée sur la mesure chronométrique d'un temps et a une grande précision. Les résultats sont exprimés par le symbole U.I.a. (unités d'iode en présence d'acide ascorbique) et rapportés à 1 mg. de catalyseur. Avec la méthode de WILLSTÄTTER le rapport de l'activité d'une peroxydase végétale à celle de l'hémoglobine est de l'ordre de 10.000 à 30.000 il tombe entre 100 et 300 avec notre méthode qui tient compte de la spécificité du catalyseur à l'égard du substrat et du peroxyde et du pH optimum du système étudié. *L'hémoglobine doit être considérée comme une peroxydase*, tant par sa spécificité relative, par son activité, que par sa sensibilité à l'action de la température et du pH. Elle est une peroxydase moyennement active dont le comportement est différent de celui des peroxydases végétales mais s'en rapproche beaucoup quand son système est « complété » par une substance réductrice dont le type le plus parfait est la vitamine C. L'hémoglobine répond à un système absolument différent de celui des peroxydases car elle oxyde directement l'acide ascorbique, la cystéine, le glutathion ; elle active les hydroperoxydes d'alcoyle environ 20 fois plus que l'eau oxygénée. Au système peroxydasique de SZENT GYORGYI (1) on peut donc opposer un système spécifique à l'hémoglobine (2) :

(1) HOOH — peroxydase — flavones — acide ascorbique.

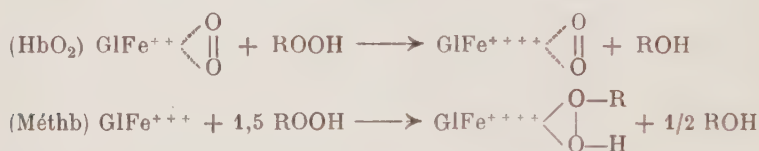
(2) ROOH — HbO_2 — acide ascorbique.

La deuxième partie est consacrée à l'étude spectrographique, colorimétrique et manométrique de l'action des peroxydes sur l'hémoglobine. Les peroxydes portent le fer de l'hémoglobine et de la méthémoglobine à un état supérieur d'oxydation. Le dérivé obtenu, de coloration rouge-violacée, est très instable ; il

a conservé la propriété de donner des composés d'addition et sa formation est représentée par les équations suivantes :



Ainsi les peroxydes ne sont pas des agents méthémoglobinisants et l'action de l'hémoglobine est liée à la formation d'un dérivé d'oxydation supérieure, très instable, dont l'activité catalytique ne diffère de celle de l'hémoglobine que par son ordre de grandeur plus élevé. Il est obtenu par la réaction :



Dans la troisième partie, nous envisageons qu'il existe dans le sang humain, en dehors de l'hémoglobine qui confère à 1 g. de ce tissu une activité peroxydasique de 1.000 U.I.a. (CH₃OOH) environ :

1° Une hydroalcoyloperoxydase plasmatique, qui se différencie de l'hémoglobine par sa spécificité plus accusée vis-à-vis des hydroperoxydes d'alcoyle et par la cinétique et le pH optimum de son action catalytique.

2° L'hydroperoxydase des globules blancs qui, comme celle du lait, est inhibée dans la vitaminose B par une substance méthylglyoxalique (Arakawa).

3° Une substance liée aux matières protéiques qui potentialise l'action peroxydasique de l'hémoglobine et déplace son pH optimum de 5,8 à 4,4. Cet activateur n'est pas spécifique vis-à-vis d'une espèce d'hémoglobine.

Nous montrons en outre que l'action peroxydasique de l'hémoglobine peut être utilisée biologiquement à ces fins d'oxydation. L'oxyhémoglobine, à une tension d'oxygène déterminée, peut faire fonction d'accepteur d'hydrogène et, à la suite de la formation d'un peroxyde, se transformer en un dérivé d'oxydation supérieure. On peut donc admettre que l'hémoglobine tant globulaire que plasmatique n'est pas un simple transporteur d'oxygène et que le sang peut être le siège de combustions catalysées par ce chromoprotéide dont l'activité est conditionnée par le pouvoir réducteur des tissus.

La quatrième partie, consacrée à l'étude des variations individuelles et pathologiques des systèmes peroxydasiques sanguins, permet les conclusions suivantes :

1° L'activité catalytique de l'hémoglobine oscille entre 1,8 à 2,5 mais est située, dans la majorité des cas, à 1,9. Elle n'est soumise à des variations pathologiques.

2° L'activité de l'hydroalcoyloperoxydase plasmatique (A) exprimée en U.I. est comprise entre 0 et 3 pour 1 cm³ de plasma. Elle est plus forte chez l'homme que chez la femme. Sa valeur est toujours faible dans les anémies qui réagissent mal au traitement, dans les néphrites azotémiques et dans tous les état cachectiques.

3° L'activation de 1,7 mgr. d'hémoglobine par le plasma est rapportée à 0,1 cm³ de plasma (B.). Sa valeur, relativement constante chez l'adulte sain, se situe entre 0,4 et 0,8. Ses variations pathologiques sont opposées à celle du système précédent (A) et B peut dépasser 3 dans certaines affections.

4° La différence A-B peut avoir une signification clinique intéressante. Elle est en règle toujours positive sur les individus normaux mais devient négative dans de nombreuses affections. Il semble que l'on puisse attribuer aux chiffres fortement négatifs une valeur pronostic défavorable.

BIBLIOGRAPHIE.

1. ABRAGAM (Mlle D.) et MAGAT (M.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1934, **116**, 1326 ; 1935, **120**, 1091.
2. ARAKAWA (T.). — *TOHOKU Journ. of exp. Méd.*, 1930, **16**, 83, 90, 107.
3. ARAKAWA (T.) et SATO. — *TOHOKU. Journ. of exp. Méd.*, 1927, **9**, 646.
4. AVERY (O. T.) et MORGAN (H.). — *Journ. of exp. Méd.*, 1924, **39**, 275.
5. AXMACHER (F.) et CELBRACHT (H.). — *Bioch. Ztschr.*, 1934, **271**, 441.
6. BACH (A.). — *C. R. Ac. Sc.*, **124**, 951.
BACH (A.). — *Oppeinheimers Hand. d. Biochem. Ergaewzungs b. Iena*, 1913, 133.
7. BACH (A.) et CHODAT (R.). — *Ber. Chem. Ges.*, 1902, **35**, 1275, 2466, 3943 ; **36**, 600 ; *Biochem. Centralbl.*, **1**, 457.
8. BACH (A.) et KULTJUGIN. — *Bioch. Ztschr.*, 1926, **167**, 227.
9. BACH (A.) et ZUBKOWA (S.). — *Bioch. Ztschr.*, 125-288.
10. BAEYER et VILLIGER. — *Ber. Chem. Ges.*, 1901, **34**, 728 ; 1900, **33**, 3, 387.
11. BANCROFT et ELLIOTT (K. A. C.). — *Bioch. Journ.*, 1934, **28**, 1911.
12. a) BANSI (H. W.) et UCKO (H.). — *Klin. Wschr.*, 1924, 927.
b) BANSI (H. W.) et UCKO (H.). — *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1926, **157**, 192.
c) BANSI (H. W.) et UCKO (H.). — *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1926, **159**, 235.
d) BANSI (H. W.) et UCKO (H.). — *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1927, **164**, 52.
e) BANSI (H. W.) et UCKO (H.). — *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1927, **169**, 178.
f) BANSI (H. W.) et UCKO (H.). — *Klin. Wschr.*, 1927, 309.
13. BATELLI. — *C. R. Ac. Sc.*, 1904, **138**, 651.
14. BATELLI et STERN. — *Bioch. Ztschr.*, 1908, **13**, 44.
15. BAUDISCH et WELO. — *Journ. of Biol. Chem.*, 1924, **61**, 261 (a).
BAUDISCH et WELO. — *Naturwissenschaften*, 127, H. **36**, 749 (b).
16. BIGWOOD (E. J.) et THOMAS (J.). — *Bull. Ac. Roy. Med. Belg.*, 1935, **15**, 439.
17. BOAS. — *Centralbl. f. inn. Medizin*, 1906, **27**, 601.
18. BOSSON (G.). — *Arch. Int. phys.* 1937, **44**, 212.
19. BURKER. — *Tigerstedts. Hand. d. phys. Meth. Leipzig.*, 1910, 124.
20. BUTTERFIELD (E. E.) et PEABODY (F. W.). — *Journ. of exp. Med.*, 1913, **17**, 5, 587.
21. CALLOW (A. B.). — *Journ. Path. et Bact.*, 1923, **26**, 332.
22. CASOLARI (A.). — *Biochem. Therap. Sper.*, 1926, **13**, 129.
23. COLE (R.). — *Journ. of Exp. Méd.*, 1914, **20**, 363.
24. CZYHLARZ (E. V.) et FÜRTH (O. V.). — *Hofmeister Beitrage. Ztschr. Chem. Phys. et Path.*, 1907, **10**, 358.
25. DEMPSTER (J.). — *Bioch. Journ.* 1934, **28**, 1048.

26. DITTRICH (P.). — *Arch. Exp. Path. et Pharmacol.*, 1891-1892, **39**, 247.
27. DIXON (M.). — *Biol. Rev.*, 1929, **4**, 352 ; *Biol. Journ.*, 1934, **28**, 2061.
28. a) ELLIOTT (K. A. C.). — *Bioch. Journ.*, 1926, **26**, 10.
b) ELLIOTT (K. A. C.). — *Bioch. Journ.*, 1932, **26**, 281.
29. ELLIOTT (K. A. C.) et KEILIN (D.). — *Proc. of the Roy. Soc. (London)*, 1934, B **114**, 210.
30. ENGLER et WEISSBERG. — *Kritische Studien über die Vorgänger der Autoxydation* 1904, 82.
31. ERHLICH (P.). — *Das Sauerstoff-Bedürfnis des Organismus*. Berlin 1885.
32. FIESSINGER (N.) et Mlle RUDOWSKA (L.). — *Arch. de Med. exp. et an. path.*, 1912, **24**, n° 5, 585, 608 ; *C. R. Soc. Biol.*, 1913, **71**, 714.
33. FIESSINGER (N.) et MATHIEU (P.). — *Journ. Physiol. et Path. Gén.*, 1922, **20**, 49.
34. FILIPOWSKI (J.). — *Arch. Soc. St Pétersbourg.*, 1895, **3**, 1.
35. FISCHER (R.). — *Wien. Klin. Wochenschr.*, 1910, **23**, 1557 ; *Arch. Journ. Mikr. Anat.*, 1913, **83**, 130.
36. FISCHER (Marie). — *Bioch. Ztschr.*, 1937, **292**, 271.
37. FÜRTH (O.) et LIEBEN. — *Bioch. Ztschr.*, 1922, **128**, 144.
38. GALLAGHER (B. M.). — *Bioch. Journ.*, 1923, **17**, 515.
39. GILBERT (A.) et FOURNIER (L.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1896, **48**.
40. GRAHAM (G. S.). — *The Journ. of Méd. Research*, septembre 1918 ; *New-York State J. of Médecine*, février 1928.
41. GRÜTER (W.). — *Cent. Bakt.* 1 Abt. Orig., 1909, **1**, 241.
42. HARRISON et THURLOW. — *Bioch. Journ.*, 1926, **20**, 217.
43. HARROP (G. A.) et BARRON (G.). — *Journ. of exp. Med.*, 1928, **48**, 207.
— *Bul. Johns. Hopkins. Hosp.*, 1919, **30**, 10.
44. HASSELBACH (K. A.). — *Bioch. Ztschr.*, 1909, **19**, 435.
45. HAUROWITZ (F.). — *Ztschr. für physiol. chem.*, 1924, **137**, 1.
— *Ztschr für physiol. Chem.*, 1924, **198**, 9.
HAUROWITZ (F.), WINKLER (A.) et FRANZ (F.). — *Z. physiol. Chem.*, 1935, **232**, 125.
— *Enzymologia*, 1937, **2**, 9.
— *Enzymologia*, 1937, **4**, 139.
46. HAYEM (G.). — *C. R. Ac. Sc.*, 1884, **98**, 580.
— *C. R. Ac. Sc.*, 1884, **102**, 698.
47. HUSZAK (St.). — *Hop Ztschr. physiol. Chem.*, 1931, **201**, 255.
— *Hop. Ztschr. physiol. Chem.*, 1937, **247**, 239.
48. IRVING (J. T.). — *Bioch. Journ.*, 1926, **20**, 613, 1320.
49. ITO (R.). — *Journ. Biochem. (Japan)* 1936, **23**, 125.
50. JOB (A.). — *Bull. Soc. Chim.*, 1923, **33**, 1561.
51. JOHNSON (S.) et ZILVA (S. S.). — *Bioch. Journ.*, 1937, **53**, 438.
52. KEILIN (D.). — *Proc. of the Roy. Soc.*, 1925, B **98**, 312.
— *Proc of the Roy. Soc.*, 1929, B **104**, 206.
53. KEILIN (D) et HARTRÉE (E. F.). — *Proc of the Roy. Soc.*, 1935, B **117**, 1.
54. KEILIN (D) et MANN (T.). — *Proc. of the Roy. Soc.*, (London) 1937, B **122**, 119.
55. KOBERT (R.). — *Arch. Phys.*, 1900, **82**, 603.
56. KUHN (R.) et BRAUN (L.). — *Ber. chem. ges.*, 1926, **59**, 2370.
— *Ztschr für physiol. chem.*, 1926-27, **157**, 164.
— *Ztschr für physiol. chem.*, 1927, **192**, 45.

57. KUHN (R), HAND (D. B.) et FLORKIN (M.) NATURWISS. — 1931, **19**, 721.
— *Ztschr für physiol. Chem.*, 1931, **201**, 255.
58. Mc LEOLD et GORDON (J. W.). — *Journ. Path et Bact.*, 1922, **25**, 127.
— *Bioch. Journ.*, 1922, **16**, 499.
59. Mc LEOLD, GORDON (J. W.) et PYRAH (L. N.). — *Journ. Path et Bact.*, 1923, **26**, 127.
60. LOWE (F.). — *Abderhalden Hdb. d. Biol. Arbeitsmeth.*, 1928, **2**, (2,1), 1461.
61. MARCHAND (F.). — *Arch für Path. et Pharmacol.*, 1887, **23**, 273.
62. MARFAN (A. B.). — *Journ. de Physiol. et de path. gén.*, 1920, **18**, 985.
63. MARFAN (A. B.) MESNARD (P. S.) et SAINT GIRONS. — *Bull. et Mém. Soc. Med. d. Hop. de Paris* 1912, 3 s, **18**, 235, 240.
64. MICHAELIS (L.) et SALOMON (K.). — *Bioch. Ztschr.*, 1931, **234**, 107.
65. MINAGAWA (T.). TOHOKU. — *Journ. of exp. Méd.*, 1937, **30**, 405.
66. MOORE et WHITLEY. — *Bioch. Journ.*, 1909, **4**, 136.
67. MORGAN (H. J.). — *Journ. Exp. Méd.*, 1924, **39**, 565.
68. NEILL (J. M.). — *The Journ. of exp. Méd.*, 1925, **41**, 299, 535, 551, 561.
69. NEILL (J. M.) et AVERY (O. T.). — *The J. of exp. Méd.*, 1924, **39**, 757.
— *The J. of exp. Méd.*, 1925, **41**, 285.
70. NEILL (J. M.) et HASTING (B.). — *The J. of Biol. Chem.*, 1925, **63**, 479.
71. NEUMANN (A.). — *Verh. dent. ges. inn. Méd.*, 1926, 549.
— *Ber. ges. Phys. Expl. Pharm.*, 1926, **38**, 549.
72. NIKOLAIEW (K.). — *Bioch. Ztschr.*, 1928, **194**, 244, 250.
73. ONSLOW (M. W.). — *Bioch. Journ.*, **17**, 216.
— *Biochem. Journ.*, **14**, 536.
74. POLONOVSKI (M.) et JAYLE (M.). — *C. R. Ac. Sc.*, 1938, **207**, 189.
75. RAY (G. B.). — *The amer Journ. of Phys.*, 1927, **82**, 405.
76. ROSSET. — *Arch. f. Klin. Medizin*, 1903, **76**, 505.
77. ROTHENFUSSER. — *Handbach der Nilch Kund Ergänzungsheft von P. Sommerfeld müncher* 1926, 24.
78. SATO (A.) et SEKIJA, TOHOKU. — *Journ. of Exp. Méd.*, 1926, **7**, 111.
79. SATO (A.) SUZUKI (T.) et SHIBATA (R.) TOHOKU. — *Journ. of Exp. Méd.*, 1934, **24**, 208.
80. SCHNABEL (A. Z.). — *Hyg. et Infections Krankh* 1921, **93**, 175.
81. SCHÖNBEIN. — *Journ. of Prakt. Chem.*, 1858, **75**, 78.
82. SCHROETER (G.). — *Berichte der gesa Phys.*, 1929, **50**, 37.
83. SIEBER. — *Ztschr. physiol. Chem.*, 1903, **39**, 484.
84. SITHARAMAN (M. V.) et RENGACHARI (S.). — *S. Indian. Chem. soc.*, 1937, **14**, 278.
85. SPITZER (G.) et TAYLOR (M. C.). — *Journ. of Dairy Science*, 1924, **7**, 234.
86. STADIE (W. C.). — *Journ. of Exp. Med.*, 1914, **33**, 627.
— *Journ. of Exp. Med.*, 1919, **30**, 215.
— *Journ. of Exp. Med.*, 1921, **33**, 627.
87. J. D. STIRLING. — *The bioch. Journ.*, 1934, **28**, 1048.
88. STOECKLIN (E. de). — Thèse Genève 1907.
89. SUMMER (J. B.) et HOWEL (F.). — *Enzymologiä* 1936, **1**, 133.
90. SUZUKI (T.). — TOHOKU, *Journ. of exp. med.*, 1934, **23**, 23.

91. SUZUKI (T.) et TAMATSU (A.). — *TOHOKU. Journ. of Exp. méd.*, 1934, **24**, 202.
92. SZENT-GYÖRGYI (A.). — a) *Biochem. Ztschr.*, 1925, **181**, 425.
— b) *Bull. Soc. chim. biol.*, 1938, **20**, 846.
— c) *Biokhimiya* 1937, **2**, 151.
93. TAKAYAMA (M.). — *Beitr. z. Toxikologic et gerichtl. medicin, Verlag Enke* 1905.
94. THUNBERG (T.). — *Skand. Arch. Phys.*, 1916, **23**, 233.
95. THURLOW. — *Bioch. Journ.*, 1925, **19**, 175.
96. TOKUE (K.). — *TOHOKU. Journ. of Exp. Méd.*, 1928, **29**, 281.
97. VAN SLYKE et STADIE. — *Journ. of biol. chem.*, 1921, **49**, 1.
98. WARBURG (O.). — *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1908, **57**, 1.
— *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1909, **59**, 112.
— *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1910, **66**, 305.
— Ueber die Katalytischen Wirkungen der lebendigen. Substanz Berlin-Springer 1912-1928.
— *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1914, **92**, 231.
— *Bioch. Ztschr.*, 1921, **119**, 134.
— *Bioch. Ztschr.*, 1923, **136**, 266.
— *Bioch. Ztschr.*, 1924, **152**, 479.
— *Bioch. Ztschr.*, 1926, **177**, 471.
99. WIELAND (H.). — *Ber. Chem. Ges.*, 1912, **45**, 2606.
— *Ber. chem. Ges.*, 1913, **46**, 3.327.
— *Ber. chem. Ges.*, 1913, **47**, 2.085.
— *Ber. chem. Ges.*, 1913, **54**, 2353.
— *Ber. chem. Ges.*, 1913, **55**, 2.639.
— *Ann. der. Chem.*, 1923, **431**, 301.
— *Ann. der. Chem.*, 1923, **434**, 185.
— *Ann. der. Chem.*, 1924, **436**, 229.
— *Ann. der. Chem.*, 1924, **439**, 196.
100. WIELAND (H.) et FRANKE. — *Ann. chem.*, 1927, **457**, 1.
101. WILLSTÄTTER (R.) et POLLINGER (A.) LIEB. — *Ann.* 1927, **430**, 269.
102. WILLSTÄTTER et WEBER (H.). — *Lieb. Ann.*, 1926, **449**, 156.
103. WILLSTÄTTER et STOLL. — *Lieb. Ann.*, 1917-1918, A. **416**, 21.
— *Lieb. Ann.*, 1920-1921, A. **422**, 47.
— *Lieb. Ann.*, 1922-1923, A. **430**, 269.
— *Lieb. Ann.*, 1923, H. Z. **130**, 281.
104. J. WOLFF et E. de STOECKLIN. — *C. R.*, **151**, p. 483.
— *Ann. Inst. Past.*, 1911, **1**, p. 313.
105. J. WOLFF. — Thèse de Doctorat Paris avril 1910.
106. J. WOLFF et N. RONCHELMANN. — *Ann. Inst. Post.* p. 96, 1917.
— *Ann. Inst. Post.*, 1921, p. 96.

Vu :

Le Président de Thèse,
M. POLONOVSKI.

Vu :

Le Doyen de la Faculté de Médecine,
M. TIFFENEAU.Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
G. ROUSSY.

TABLE DES MATIÈRES.

CHAPITRE PREMIER.

<i>Etude comparative de l'action catalytique des peroxydases végétales et de l'hémoglobine.....</i>	1
Peroxydases végétales	2
I. Nomenclature	2
II. Méthode de préparation	3
III. Recherche qualitative des peroxydases.....	5
IV. Dosage de l'activité peroxydasique.....	5
V. Activation comparée du peroxyde d'hydrogène et des hydroperoxydes d'alcoyle par les peroxydases.....	11
VI. Influence des réducteurs, du pH et de la température sur la réaction peroxydasique	12
VII. Constitution des peroxydases	15
VIII. Mécanisme des actions oxydasiques et peroxydasiques	15
IX. Rôle biologique des peroxydases	17
Action peroxydasique de l'hémoglobine.....	20
I. Préparation de l'oxyhémoglobine cristallisée.....	21
II. Dosage de l'hémoglobine	21
III. Action peroxydasique de l'oxyhémoglobine.....	22
Action peroxydasique des dérivés de l'hémoglobine.....	32

CHAPITRE II.

<i>Etude spectrographique, colorimétrique et manométrique de l'action des peroxydes sur l'oxyhémoglobine. — Existence d'un dérivé d'oxydation supérieure du pigment sanguin.....</i>	35
I. Etude spectrographique et manométrique de la formation de la méthémoglobine acide.....	38
II. Etude spectrographique, colorimétrique et manométrique de l'action des peroxydases sur l'oxyhémoglobine de la méthémoglobine	40
III. Etude spectrographique et colorimétrique de l'action du ferricyanure et du peroxyde sur COHb.....	48
Conclusions générales	50

CHAPITRE III.

<i>Peroxydases animales. Leur spécificité et leur rôle biologique.</i>	53
I. Action peroxydasique du lait	55
II. Action peroxydasique du sang	58
III. Rôle biologique de l'hémoglobine	68
Discussion	73

CHAPITRE IV.

<i>Variations individuelles et pathologiques de l'action peroxydasiques du sang</i>	77
I. Technique du prélèvement du sang	77
II. Activité peroxydasique de l'oxyhémoglobine.....	78
III. Activité peroxydasique du plasma sanguin	79
Résultats	80
Conclusions	88
OBSERVATIONS	89
CONCLUSIONS GÉNÉRALES	97
BIBLIOGRAPHIE	101

IMPRIMERIE M. DECLUME
LONS-LE-SAUNIER

